











HANDBUCH

DER

BIOCHEMISCHEN ARBEITSMETHODEN.

V. BAND.

I. TEIL.



HANDBUCH

DER

BIOCHEMISCHEN ARBEITSMETHODEN.

BEARBEITET VON

Prof. Dr. **E. Abderhalden**, Berlin — Prof. Dr. **W. Autenrieth**, Freiburg i. Br. — Prof. Dr. **H. Bechhold**, Frankfurt a. M. — **M. T. Burrows**, New-York — Prof. Dr. **A. Carrell**, New-York — Dr. phil. **Edelstein**, Berlin — Exz. Geh. Rat Prof. Dr. **Emil Fischer**, Berlin — Prof. Dr. **Otto Folin**, Boston — Prof. Dr. **Sigmund Fränkel**, Wien — Priv.-Doz. Dr. **Führer**, Freiburg i. Br. — Priv.-Doz. Dr. **Fuhrmann**, Graz — Geh. Rat Prof. Dr. **V. Hensen**, Kiel — Prof. Dr. **M. Kumagawa**, Tokio — Priv.-Doz. Dr. **E. Letsche**, Tübingen — Dr. phil. **P. A. Levene**, New-York — Prof. Dr. **Lockemann**, Berlin — Dr. med. **H. Lohrisch**, Chemnitz — Prof. Dr. **E. S. London**, St. Petersburg — Prof. Dr. **Macallum**, Toronto — Prof. Dr. **Leonor Michaelis**, Berlin — Prof. Dr. **Morawitz**, Freiburg i. B. — Prof. Dr. **Franz Müller**, Berlin — Prof. Dr. **Hermann Pfeiffer**, Graz — Prof. Dr. **Pohl**, Prag — Prof. Dr. **Pregl**, Innsbruck — Priv.-Doz. Dr. **Ernst G. Pringsheim**, Halle a. S. — Priv.-Doz. Dr. **H. Pringsheim**, Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Rohde**, Heidelberg — Dr. med. und phil. **P. Rona**, Berlin — Dr. phil. **van Slyke**, New-York — Hofrat Prof. Dr. **J. Stoklasa**, Prag — Prof. Dr. **J. Traube**, Berlin — Priv.-Doz. Dr. **Völtz**, Berlin.

HERAUSGEGEBEN VON

PROF. DR. EMIL ABDERHALDEN,
DIREKTOR DES PHYSIOL. INSTITUTES DER TIERÄRZTL. HOCHSCHULE, BERLIN.

FÜNFTER BAND.

ERSTER TEIL.

MIT 168 TEILS MEHRFARBIGEN TEXTABBILDUNGEN.

URBAN & SCHWARZENBERG
BERLIN — WIEN
N., FRIEDRICHSTRASSE 105b — I., MAXIMILIANSTRASSE 4
1911.

Vorwort.

In Band 1—4 des Handbuchs der biochemischen Arbeitsmethoden sind die einzelnen Methoden nach den einzelnen Operationen und den einzelnen Stoffen geordnet. So finden sich zum Beispiel die Methoden zur Isolierung der Verbindungen, die im Harn vorkommen, einzeln nach diesen geordnet. Diese Art der Wiedergabe der Methoden genügt nicht für alle Fälle. Sehr oft kommt man in die Lage, mehrere Stoffe nebeneinander bestimmen zu müssen. Oft bringt auch im Einzelfalle die Art des Ausgangsmateriales, aus dem man einen bestimmten Stoff gewinnen möchte, Besonderheiten mit sich. Der vorliegende Band soll derartige Lücken ausfüllen. Er gibt Anweisung, wie man Gesamtblut, Harn, Milch etc. auf die einzelnen Bestandteile verarbeitet. Bei der Wiedergabe der einzelnen Methoden ist Rücksicht auf das in den bereits erschienenen Bänden Enthaltene genommen worden, doch nur dann, wenn ein Hinweis ohne Störung des Zusammenhangs möglich war. Die einzelnen Methoden sind auch hier wiederum so geschildert, daß direkt nach den Vorschriften gearbeitet werden kann.

Der vorliegende Band bringt ferner neben manchen Ergänzungen zu den bereits erschienenen Bänden des Werkes noch zahlreiche neue Kapitel. Es sind speziell die Grenzgebiete der Biochemie berücksichtigt worden. Weitere Ergänzungsbände sollen in größeren Zeitabschnitten fortlaufend über Verbesserungen alter Methoden und Ausarbeitung neuer berichten.

Berlin, den 15. August 1911.

Emil Abderhalden.



Inhaltsverzeichnis.



Nachweis und Bestimmung von Giften auf biologischem Wege.

Von **Hermann Fühner**, Freiburg i. Br.

Einleitung.

Biologische Methoden finden einmal zum qualitativen Nachweis von Giften Verwendung und besitzen hier namentlich forensisch-toxikologische Bedeutung; sie können aber auch zu quantitativen Bestimmungen von Giften, in erster Linie zur Gehalts- und Wertbestimmung von Chemikalien und Drogen herangezogen werden und haben dann hauptsächlich pharmazeutisch-medizinisches Interesse.

Die wichtigsten bisher in beiden Richtungen bekannt gewordenen Methoden sind nachstehend zusammengestellt.

Zum Nachweis der meisten anorganischen Gifte sind biologische Proben überflüssig. Die vielgenannte biologische Methode zum Nachweis von Arsenik ist wohl rasch und bequem ausführbar und in forensischen Fällen wenigstens als Vorprobe verwendbar; aber angesichts der scharfen und sichereren chemischen Proben tritt ihre Bedeutung hier zurück. Anders bei organischen Giften. Selbst bei Substanzen, die sich chemisch und mikrochemisch gut charakterisieren lassen, wie das Strychnin, wird in forensischen Fällen doch kein Sachverständiger neben dem chemischen Nachweis auf den charakteristischen Tierversuch am Frosche oder der hier empfindlicheren weißen Maus verzichten wollen. Erst der positive Ausfall von charakteristischen chemischen **und** biologischen Proben bietet bei derartigen Pflanzengiften die Gewähr für die Richtigkeit der Diagnose.

Gilt dies schon für Substanzen wie das Strychnin, welche leicht in reiner kristallinischer Form aus Leichenmaterial gewonnen werden können, so ist solches in noch höherem Maße der Fall bei Produkten, die nicht kristallinisch und auch kaum in reiner Form aus forensischem Material zu isolieren sind. Hier wird in vielen Fällen der biologische Nachweis wichtiger sein als der chemische, z. B. bei Aconitin, Nicotin und Veratrin. Bei noch komplizierter gebauten Giften vollends, wie bei den sogenannten Toxalbuminen Abrin, Ricin u. a. oder den tierischen Giften, versagen die

chemischen Nachweismethoden durchaus und wir sind zum Nachweis dieser Substanzen ausschließlich auf biologische Proben angewiesen.

Die chemischen Identitätsreaktionen der organischen Gifte bestehen zumeist nur in rasch vergänglichen Farbenreaktionen, welche überdies mit einer Zerstörung des Giftes verbunden sind. Bei den meisten biologischen Proben dieser Gifte wird die betreffende Substanz nicht zerstört, sondern kann aus dem Versuchsobjekt wiedergewonnen werden. Außerdem lassen sich die Vergiftungserscheinungen am lebenden Objekt häufig in Form einer Kurve oder einer Photographie aufnehmen und so dauernd fixieren, was für forensische Fälle besonders wertvoll erscheint.

Erwähnt sei noch, daß viele biologische Proben auch mit den nicht völlig rein dargestellten Giften einwandfreie Resultate ergeben, während eine große Anzahl der chemischen Identitätsreaktionen, an unreinem Material angestellt, unsicher werden oder völlig versagen.

Im übrigen ist es durchaus nicht die Aufgabe biologischer Reaktionen, die chemischen Proben zu ersetzen oder überflüssig zu machen. Es wird in den meisten Fällen durch den biologischen Nachweis lediglich die Sicherheit des chemischen Befundes erhöht werden. Im Prinzip empfiehlt es sich, irgend ein unbekanntes Gemenge nicht einfach einem Tiere beizubringen, um seine Giftigkeit zu erweisen, sondern man wird dasselbe nach dem bewährten Gange der toxikologisch-chemischen Analyse erst in verschiedene schon weitgehend gereinigte Bestandteile zerlegen und erst mit diesen etwaige chemische und biologische Reaktionen anstellen. Alle biologischen Prüfungen sind mit neutral reagierenden Lösungen auszuführen.

Quantitative biologische Bestimmungen finden heute Verwendung zur Prüfung von Desinfektionsmitteln, von Digitalisblättern, Fiebermitteln, Nebennierenpräparaten u. a. m., Methoden, welche sich, wie auch die qualitativen Proben, leicht noch vermehren lassen.[1])

Unter „biologischem Nachweis" von Giften verstehen wir den Nachweis derselben unter Verwendung lebender pflanzlicher oder tierischer Objekte. Es kann sich dabei um vollständige Organismen oder deren Teile handeln. Ausschlaggebend ist, daß die Objekte leben, denn wir wollen aus den veränderten Funktionen eines Lebewesens oder seiner Teile oder dadurch, daß wir das Leben vernichten, auf die Anwesenheit von Gift schließen. Das biologische Objekt dient uns als „lebendes Reagens". Demnach ist z. B. der Nachweis von Kohlenoxyd unter Verwendung von Blut kein biologischer Nachweis, denn hierbei ist nur der Blutfarbstoff, nicht aber die lebende rote Blutzelle erforderlich. Zum Nachweis von Saponinen hingegen bedarf man lebender Blutkörperchen, welche durch diese Gifte zerstört, hämolysiert werden.

Die Gliederung des Stoffes erfolgt nachstehend nach biologischen Objekten; diese sind in folgender Anordnung behandelt:

[1]) Vgl. *W. Straub*, Physiologische Wertbestimmung von Drogen, speziell der Folia Digitalis. Münchener med. Wochenschr., 1910, Nr. 37, S. 1941.

Schimmelpilze, Bakterien, Protozoen, Blut, der Frosch und seine Teile (Skelettmuskel, Nervmuskelpräparat, Herz, Gefäßpräparat, Auge), Maus, Kaninchen, Mensch.

Möglichst ausgiebig zur Charakterisierung der Gifte ist der Frosch und seine isolierten Organe herangezogen worden, während von einer Verwendung von Objekten, welche operative Eingriffe am Warmblüter erfordern, abgesehen wurde. Es käme hier auch einzig die isolierte Gebärmutter zur Wertbestimmung von Mutterkornpräparaten nach *Kehrer* in Betracht.

Schimmelpilze.

Zahlreiche Prüfungen über die Empfindlichkeit von Schimmelpilzen, Giften gegenüber, sind schon angestellt worden. Hier soll aus den Ergebnissen derselben nur erwähnt werden, daß Schimmelpilze wie auch Hefen im allgemeinen Giften gegenüber recht widerstandsfähig sind, und zwar in viel höherem Maße, als Algen und Blütenpflanzen.

Diese Eigenschaft der Schimmelpilze ist von Bedeutung für den hier zu besprechenden Nachweis von Arsenik mit Hilfe gewisser Schimmelpilze, welche noch bei hohem Arsengehalt ihres Nährbodens gedeihen können.

Die in Betracht kommenden Pilze entwickeln beim Wachsen auf arsenhaltigem Substrat charakteristischen Knoblauchgeruch und diese Geruchsreaktion ist eine derart intensive, daß sie zum Nachweis selbst kleinster Mengen von Arsenik Verwendung finden kann.

Die Tatsache, daß in feuchten Zimmern mit arsenhaltigen Tapeten Knoblauchgeruch unter Umständen auftritt, war seit langer Zeit bekannt und ist schon 1839 von *L. Gmelin* und später von anderen Forschern näher untersucht worden. Daß dieses Auftreten flüchtiger Arsenverbindungen aber auf die Einwirkung von Schimmelpilzen zurückzuführen ist, wurde erst 1892 von *B. Gosio*[1]) erkannt und wurde von ihm auch zu einer Methode des Arsennachweises ausgearbeitet.

Der Nachweis von Arsen und seinen Verbindungen.

Nicht alle, als Verunreinigung der Luft sich findenden Schimmelpilze (Mucor-, Aspergillus-, Penicilliumarten) besitzen die Eigenschaft, feste Arsenverbindungen in flüchtige, nach Knoblauch riechende Verbindungen zu verwandeln. Diese Eigenschaft ist auf einige, von *Gosio* „Arsenschimmel-

[1]) *B. Gosio,* Azione di alcune muffe sui composti fissi d'arsenico. Rivista d'igiene e sanità pubblica. 1892. p. 201. — Derselbe, Action de quelques moisissures sur les composés fixes d'arsénic. Arch. italiennes de Biologie. T. 18. p. 253 (1893). — Derselbe, Zur Frage wodurch die Giftigkeit arsenhaltiger Tapeten bedingt wird. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. 30. S. 1024 (1897). — Die Entdeckung von *Gosio* wurde von *O. Emmerling* [Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. 30. S. 1025 (1897)] angezweifelt, aber von zahlreichen Untersuchern, wie *Ch. R. Sanger*, *Morpurgo* und *Brunner*, *Baumert*, *Abel* und *Buttenberg* vollauf bestätigt.

pilze" genannte Arten beschränkt und findet sich sehr gut ausgeprägt bei dem von diesem Forscher zum Arsennachweis empfohlenen Penicillium brevicaule.[1])

Man kultiviert den Pilz auf Kartoffelkeilen, hält die Kulturen bei Zimmertemperatur und impft 1—2mal im Jahre um. Die Kulturen sind mindestens 1 Jahr lang lebensfähig. Die alten mit einem Überzug von hellbraunen Sporen bedeckten Kulturen sind zum Überimpfen auf frische Kartoffelstücke und auf Nährsubstrate, welche auf Arsen geprüft werden sollen, geeignet.

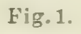
Zur Herstellung frischer Kartoffelkulturen sticht man mit einem weiten Korkbohrer aus rohen, gewaschenen und geschälten Kartoffeln Zylinder aus, spaltet diese durch einen Schrägschnitt in zwei Keile, die man in Reagenzgläser bringt, auf deren Boden sich etwas Watte befindet. Die Reagenzgläser werden mit einem Wattepfropf verschlossen und entweder im Autoklaven bei 1·5—2 Atmosphären 20—30 Minuten oder im Dampfkochtopf 1 Stunde sterilisiert. Man kann die Reagenzgläser auch, in ein Becherglas gestellt, in das kochende Wasserbad einhängen. Über die Reagenzgläser stülpt man ein weiteres Becherglas, läßt 1 Stunde im Wasserbad stehen und dann, nach Abdrehen der Heizung, in demselben erkalten. Dieses Erhitzen und Abkühlenlassen wiederholt man an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Es hat den Zweck, die resistenten Kartoffelsporen zum Auskeimen zu bringen und die Keime nachher abzutöten. Hat sich am Boden der Reagenzgläser Kondenswasser angesammelt, so gießt man dieses ab und ersetzt die naß gewordenen Wattepfröpfe durch neue in der Flamme abgebrannte. Auf die sterilen Keile impft man dann etwas braunes Sporenmaterial mit einem Platindraht in bekannter Weise, unter Vermeidung von Infektion durch Luftkeime, und bringt die Reagenzgläser in den Brutschrank (Temperatur 30—32°). Sind die Kartoffelstücke sehr naß, so wachsen die Pilze bis zur oberflächlichen Austrocknung derselben langsam. Bei richtigem Feuchtigkeitsgehalt der Kartoffelstücke ist nach 24stündigem Wachstum die Pilzkolonie schon gut sichtbar. Nach 2 Tagen hat sich ein weißer Pilzrasen gebildet. Nunmehr läßt man bei Zimmertemperatur weiter wachsen.

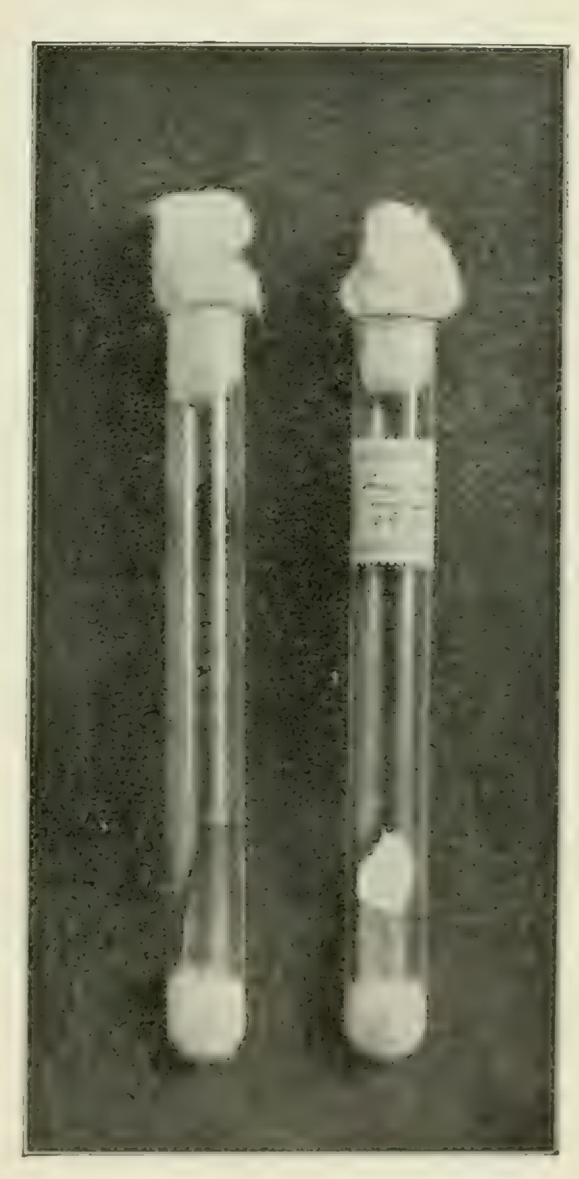
Fig. 1 zeigt in einem Reagenzglase einen Kartoffelkeil und in dem daneben befindlichen einen solchen mit einer Schimmelpilzkultur nach dreitägigem Wachstum. Die Kultur bildet einen rein weißen Rasen vom Aussehen eines Wattebausches. Etwa nach 2 Wochen beginnt die Bildung brauner Sporen.

Als Nährboden für Penicillium brevicaule kommt zum Zwecke des Arsennachweises Kartoffelbrei und Brotbrei in Betracht. Kartoffel ist für manche Untersuchungen weniger geeignet als Brot, da ihre Wasseraufnahmefähigkeit eine begrenzte ist. Außerdem haben manche Kartoffelsorten einen eigentümlichen Geruch, welcher bei der Geruchsdiagnose des Arsens

[1]) Der Pilz kann von Dr. *G. Grübler & Co.*, Leipzig und von Prof. *Král*, Prag, bezogen werden.

störend sein kann. Darum ist nach *Abel* und *Buttenberg*[1]) Brot der Kartoffel vorzuziehen, und zwar möglichst geruchloses Grau- oder Weißbrot nach Entfernung der Rinde. Bei richtigem Feuchtigkeitsgehalt wächst auf Brot und Kartoffeln Penicillium brevicaule rasch, auch wenn dieselben zur Arsendiagnose mit zerhackten Leichenteilen, Kot, Harn etc. vermengt sind. Penicillium brevicaule zeigt in Reinkulturen, im Gegensatz zu anderen Schimmelpilzen, keinen muffigen Geruch, so daß der Knoblauchgeruch in Arsenkulturen rein zur Geltung kommt.


Fig. 1.



Reinkultur von Penicillium brevicaule

Die wertvollste Eigenschaft des Penicillium brevicaule ist aber, daß der Knoblauchgeruch noch bei sehr geringen Arsenmengen auftritt. Nach *Abel* und *Buttenberg* ist die äußerste Grenze der Reaktion für die arsenige Säure **1/100—1/1000 *mg***, für die wasserunlöslichen Produkte *Scheele*sches Grün, Schweinfurter Grün, Realgar und Auripigment etwa **1/100 *mg***, während metallisches Arsen nur in Mengen von **1/10 *mg*** an nachzuweisen ist. Auch die modernen organischen, als Arzneimittel dienenden Arsenverbindungen, wie kakodylsaures Natron, Atoxyl, Arsazetin und Salvarsan, werden von Penicillium brevicaule unter Auftreten von Knoblauchgeruch zersetzt.

Da die Empfindlichkeit der Reaktion mit der Empfindlichkeit des Geruchsorgans des Untersuchers schwankt, so kann die Methode nur zum qualitativen Arsennachweis dienen.

Die flüchtigen, durch Einwirkung der Schimmelpilze entstehenden Verbindungen bestehen zum kleinen Teil aus Arsenwasserstoff, AsH_3, zum größeren, wie *Biginelli*[2]) (1900) nachgewiesen hat, aus Diäthylarsin,

[1]) *R. Abel* und *P. Buttenberg*, Über die Einwirkung von Schimmelpilzen auf Arsen und seine Verbindungen. Der Nachweis von Arsen auf biologischem Wege. Zeitschr. f Hygiene u. Infektionskrankh. **32**. S. 449 (1899).

[2]) *P. Biginelli*, Zusammensetzung und chemische Konstitution des arsenikhaltigen Gases der Tapeten. (I. Mitteilung.) Atti R. Accad. dei Lincei Roma. (5.) 9. II. p. 210 und

$AsH(C_2H_5)_2$. Die Gegenwart von Arsenwasserstoff in den Gasen läßt sich objektiv durch die *Bettendorf*sche Silbernitratprobe erweisen, wozu allerdings bemerkt werden muß, daß in den Untersuchungsflaschen neben Arsenwasserstoff noch andere Silberlösung schwärzende Gase (Schwefelwasserstoff) auftreten können.

Wichtig ist, daß die Antimonverbindungen unter der Einwirkung von Schimmelpilzen keine riechende Verbindung geben. Hingegen erzeugen die Pilze bei Gegenwart fester Selen- und Tellurverbindungen, nach *Maassen* [1]), flüchtige riechende Verbindungen. Die Selenverbindungen liefern ein merkaptanähnlich riechendes Gas; die Tellurverbindungen aber ein solches, dessen Geruch von dem Arsenknoblauchgeruch nicht zu unterscheiden ist. Alle von *Maassen* untersuchten Schimmelpilze liefern mit Tellurverbindungen diesen Geruch, dabei auch solche, welche Arsenverbindungen nicht vergasen, ein Unterschied, welcher sich differentialdiagnostisch verwerten läßt.

Der Hauptvorzug der biologischen Methode des Arsennachweises gegenüber den chemischen Methoden besteht darin, daß organisches Material, z. B. von Leichen, direkt, ohne vorherige Zerstörung der organischen Substanz zum Arsennachweis Verwendung finden kann. In einem Versuche an einem Kaninchen, welches mit 50 *mg* arseniger Säure (in Form des offizinellen Liquor Kali arsenicosi [5 *g*] in 30 *cm*³ Wasser mit der Schlundsonde beigebracht) vergiftet worden war, konnte im Harn, der vor dem Tode des Tieres ausgeschieden wurde, in solchem, der aus der Blase des toten Tieres entnommen wurde, dann im Magen- und Darminhalt, in Niere, Leber und Herz Arsenik durch die Pilzreaktion festgestellt werden, nicht hingegen im Gehirn des Tieres.

Bei Abwesenheit von Tellur (Selen) hat sich die Methode namentlich beim Vorhandensein viel organischen Materials mit geringem Arsengehalt oder in Fällen, wo zahlreiche Arsenproben nebeneinander vorzunehmen sind, nützlich erwiesen. Sehr geeignet ist sie auch zur Verfolgung der Arsenausscheidung in den Exkreten bei therapeutischer Verwendung von Arsenpräparaten. In forensischen Fällen kann sie nicht als ausschließliche Methode verwandt werden. Doch bei ihrer, der *Marsh*schen Probe nahezu gleichkommenden Empfindlichkeit, wird sie als Vorprobe, welche mit einem nur äußerst geringen Arsenverlust durch Vergasung verbunden ist und deren Material, wenn nötig, nachträglich zur weiteren chemischen Prüfung gebraucht werden kann, wertvolle Dienste leisten können.

Ausführung der Prüfung. [2]) Gekrümeltes, möglichst geruchloses Weiß- oder Graubrot (ohne Rinde) wird mit dem zu untersuchenden, fein

---

Gaz. chim. ital. 31. I. p. 58; refer. Chem. Zentralbl. 1909. II. S. 1067. (II. Mitteilung.) Ibidem. S. 1100.

[1]) *A. Maassen*, Die biologische Methode *Gosios* zum Nachweis des Arsens und die Bildung organischer Arsen-, Selen- und Tellurverbindungen durch Schimmelpilze und Bakterien. Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte. 18. S. 475 (1902).

[2]) Nach *Abel* und *Buttenberg*, l. c. S. 464.

zerkleinerten Material innig gemischt und mit so viel Wasser versetzt, daß ein fester, nicht zu nasser Brei entsteht. Bei Flüssigkeiten wird so viel trockenes Brot zugesetzt, als zur vollständigen Aufsaugung nötig ist. Reagiert das Untersuchungsmaterial alkalisch, so muß es mit Weinsäure neutral oder bequemer sauer gemacht werden. Der Säureüberschuß wird durch Zusatz von reinem Calciumcarbonat beseitigt. Desgleichen wird saures Material durch Calciumcarbonat, von welchem ein Überschuß vorhanden sein kann, neutralisiert. In schwach saurem Material gedeihen die Pilze am besten.

Die dicke Masse bringt man in Erlenmeyerkolben von mindestens 100 cm^3 und gibt auf die Oberfläche noch Inseln von reinem feuchten Brot, damit sich auf diesen die Schimmelpilze erst ansiedeln und von ihnen aus das als Nährsubstrat oft weniger günstige Untersuchungsmaterial allmählich durchwuchern können.

Enthält das Untersuchungsmaterial anorganische Desinfektionsmittel, wie Quecksilberchlorid, Silber- oder Kupfersalze, so muß dasselbe erst mit Schwefelwasserstoff behandelt werden, da die Metalle das Pilzwachstum hemmen könnten. Flüchtige, desinfizierende Zusätze, wie Chloroform, Toluol, Formaldehyd, Phenole wird man zum Teil durch Erhitzen auf dem Wasserbade entfernen, zum Teil durch reichliche Verdünnung des Materials mit Brot unschädlich machen können.

Neben den Kulturen mit dem zu untersuchenden Material wird man stets eine Kontrollkultur anlegen, um festzustellen, ob das verwandte Brot und Wasser arsenfrei sind und die Pilzkultur entwicklungsfähig ist.

Die mit Wattebausch verschlossenen Kolben werden nunmehr im Dampfkochtopf oder Autoklaven sterilisiert und nach dem Erkalten mit sporenhaltigen Kulturen beschickt. Hat man alte vertrocknete Reagenzglaskulturen, so kann man sie mit sterilem Brunnenwasser oder Nährbouillon durchschütteln und mit der Sporenaufschwemmung den Brei im Erlenmeyerkolben übergießen. Jüngere Kulturen auf Kartoffelkeilen läßt man am besten in toto in die Erlenmeyerkolben gleiten, natürlich mit der nötigen Vorsicht, um Luftinfektion zu vermeiden. Den Erlenmeyerkolben verschließt man gut mit abgebranntem Wattepfropf, darüber mit dichter Gummikappe und setzt ihn in den Brutschrank in eine Temperatur von 30 bis 32°. Bei Gegenwart von Arsenik kann man in günstigen Fällen schon nach 24 Stunden und früher[1]) Knoblauchgeruch wahrnehmen, der dann zunimmt, je mehr die Pilzrasen wachsen. Bei geringer Entwicklung muß man den Wattepfropf bei der Geruchsprüfung abnehmen. Hat man an einer kräftig riechenden Kultur gerochen, so muß man erst geraume Zeit zuwarten, bis man die Diagnose an einer schwach riechenden Kultur stellen kann.

Der Geruch hält sich in den Kulturen, auch ohne Gummikappe und selbst bei kleinen Arsenmengen, mehrere Monate lang.

[1]) Beim Zusammenbringen einer frischen kräftig gewachsenen Pilzkultur mit arsenhaltigem Material in Pulverform, mit dem man die Kultur einfach bestreuen kann, läßt sich Knoblauchgeruch oft schon nach 3—4 Stunden wahrnehmen. (*Morpurgo* und *Brunner.*)

Bakterien.

Die Bakterien (Schizomyzeten, Spaltpilze) gehören morphologisch zu den niedrigsten Pflanzen und haben verwandtschaftliche Beziehungen zu den Algen und den Schlauchpilzen (Askomyzeten). Sie sind einzellig, fast immer chlorophyllfrei und besitzen meist Stäbchen- oder Kugelform.

Man unterscheidet vegetative Formen, die sich durch einfache Querteilung vermehren, und Dauerformen, Sporen, welche auf geeignetem Nährboden „auskeimen" und sich biologisch von den vegetativen Formen durch viel größere Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Schädigungen auszeichnen.

Von den Bakterien leben manche als Saprophyten. Medizinische Bedeutung besitzen aber vor allem die parasitären Formen, die als Krankheitserreger in Betracht kommen und zu deren Vertilgung — Desinfektion — man teils auf physikalischem, teils auf chemischem Wege gelangt.

An dieser Stelle können nur die chemischen Desinfektionsmittel und ihre Wertbestimmung an Bakterien als Testobjekten besprochen werden, Methoden, welche auf den grundlegenden Arbeiten über Desinfektion von *Robert Koch*[1]) basieren.

Bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln an Bakterien müssen zwei Punkte streng unterschieden werden: Die entwicklungshemmende und die bakterientötende Wirkung derselben.[2]) Bei Substanzen, welche z. B. als innere Desinfizientien an Menschen und Tieren angewandt werden, wird es zumeist genügen, wenn sie imstande sind, die Entwicklung der Bakterien zu hindern, ohne dieselben abzutöten. Die Entwicklungshemmung von Bakterien zu erreichen gelingt relativ leicht und durch viele, auch für den Tierkörper wenig giftige Stoffe. Zur Abtötung derselben, sofern sie mit einem zu prüfenden Desinfektionsmittel überhaupt möglich ist, ist viel intensivere Einwirkung nötig. Alle bisher bekannten bakterientötenden Mittel sind auch für den Tierkörper giftig und es ist bis heute kein brauchbares Mittel gefunden, Bakterien im Tierkörper abzutöten, wie dies bei krankheitserregenden Protozoen möglich ist.

Verbringt man Bakterien in einen Nährboden, der eine bestimmte Menge eines Desinfektionsmittels enthält, so wachsen sie darin nicht weiter; sie sind in ihrer Entwicklung gehemmt. Impft man sie aber auf einen geeigneten neuen Nährboden über, so wachsen sie normal. Zur Entwicklungshemmung der Milzbrandbazillen genügt nach *R. Koch* der Gehalt einer Nährgelatine von 1 : 1 Million an Quecksilberchlorid. In dieser entwicklungshemmenden Konzentration werden die Bakterien nicht primär abgetötet, sondern sie sterben erst sekundär an Degeneration nach langem Verweilen in dem gifthaltigen Nährboden. Bei der Entwicklungshemmung

[1]) *R. Koch*, Über Desinfektion. Mitteilungen a. d. kaiserl. Gesundheitsamte. 1881.

[2]) *Th. Paul*, Entwurf zur einheitlichen Wertbestimmung chemischer Desinfektionsmittel. Berlin 1901. S. 5.

kommt lediglich die Konzentration der giftigen Stoffe in Frage. Diese Konzentration ist für dasselbe Desinfiziens bei verschiedenen Bakterienarten sehr verschieden und schwankt auch bei denselben Individuen sehr bedeutend je nach der Zusammensetzung des Nährbodens, der Temperatur, dem Feuchtigkeitsgrad, dem Alter der Kulturen usw.[1] Verbringt man Bakterien hingegen in starke Sublimatlösungen und läßt sie eine bestimmte Zeit darin verweilen, so werden sie abgetötet und wachsen auch nach völliger Entfernung des an ihnen haftenden Giftes auf einem neuen Nährboden nicht weiter. Bei Abtötung kommt neben der Konzentration der Giftlösung noch ihre Einwirkungsdauer in Betracht, die im allgemeinen desto kürzer sein kann, je stärker die Lösung ist.

Von ausschlaggebender Bedeutung für die desinfizierende Wirkung chemischer Produkte ist das Medium, in welchem sich die Bakterien befinden. Gelingt es in feuchter Luft leicht, z. B. durch Chlor, Bakterien abzutöten, so ist dessen Wirkung in organischem Material sehr vermindert, da es zur Oxydation desselben verbraucht und für die Bakterien dadurch unwirksam wird. Auch Metallsalze, z. B. Sublimat, verlieren in eiweißhaltigen Lösungen, mit denen die Metallsalze Fällungen geben, viel von der Intensität ihrer Wirkung. Weniger ist diese Abnahme der Wirkung in Eiweißlösungen festzustellen bei aromatischen Desinfektionsmitteln (Phenol, Lysol usw.).

Bei der Prüfung der Desinfektionsmittel erhält man, wie bei allen biologischen Wertbestimmungen keine absoluten, sondern nur relative Werte, die auf irgend eine Vergleichseinheit zurückgeführt werden müssen. Vergleichbar sind die Resultate verschiedener Versuche nur dann, wenn sie unter genau denselben Bedingungen ausgeführt sind. Die zu prüfenden Desinfektionsmittel werden, je nach dem Zwecke, dem sie dienen sollen, mit Substanzen von bekannter Wirksamkeit verglichen: so für die Luftdesinfektion mit Formalin, für Flüssigkeitsdesinfektion mit Sublimat oder Phenol, für Wunddesinfektionsmittel mit Jodoform.

Da, wie gesagt, die entwicklungshemmende Wirkung chemischer Desinfektionsmittel unter sonst gleichen Bedingungen lediglich von der Konzentration der Lösung abhängt, während der bakterizide Wert gleichzeitig eine Funktion der Einwirkungszeit darstellt (*Krönig* und *Paul*), so müssen auch die Methoden, welche dazu dienen, genannte Werte zu bestimmen, wesentlich von einander verschieden sein. Nachstehend sind die wichtigsten heute gebrauchten Methoden wiedergegeben.[2])

1. Methoden zur Bestimmung der entwicklungshemmenden Kraft chemischer Desinfektionsmittel.

Bei der Anstellung von Versuchen über Entwicklungshemmung ist es nötig, daß außer der Konzentration des zu prüfenden Desinfektions-

[1]) *Th. Paul*, l. c. S. 6.

[2]) Ich folge in meinen Ausführungen hier hauptsächlich der Darstellung von *K. Laubenheimer* in seiner Publikation: Phenol und seine Derivate als Desinfektionsmittel. Berlin 1909.

mittels alle anderen Bedingungen durchaus gleich sind, damit wirklich vergleichbare Resultate erzielt werden.

Von solchen Bedingungen, die geeignet sind, das Resultat der Untersuchung zu beeinflussen, ist in erster Linie die verschiedene Resistenz der benutzten Testbakterien zu nennen. Verschiedene Stämme derselben Bakterienart können sich gegen schädigende äußere Einflüsse wesentlich verschieden verhalten.

Auch die Zahl der dem Desinfiziens ausgesetzten Keime scheint das Ergebnis zu beeinflussen, und zwar in dem Sinne, daß vollständige Entwicklungshemmung bei größerer Einsaat schwieriger zu erreichen ist, wie wenn nur wenige Bakterien dem Nährboden zugesetzt werden.

Ferner wird das Resultat wesentlich durch die Wahl des zur Anwendung kommenden Nährsubstrates beeinflußt. Je eiweißreicher ein Medium ist, in dem die entwicklungshemmende Kraft eines Desinfiziens geprüft wird, desto mehr wird letzteres in seiner Wirkung, den Bakterien gegenüber, beeinträchtigt werden. Dies gilt, wie schon oben bemerkt, in höherem Maße für die eiweißfällenden Metalle, wie Quecksilber und Silber, als für die Phenole und ihre Derivate.

Wichtig ist dann auch, daß die Versuche bei bestimmter, sich gleichbleibender Temperatur ausgeführt werden. Die Entwicklungshemmung, die ein Desinfiziens auszuüben vermag, wird am geringsten bei dem Temperaturoptimum des zur Prüfung verwandten Mikroorganismus sein. Je mehr die Temperatur sich von dem Optimum nach oben oder unten hin entfernt, desto mehr wird die Entwicklungshemmung in Erscheinung treten, was bemerkenswert ist insofern, als bei Bestimmung der keimtötenden Kraft eines Desinfiziens die Verhältnisse umgekehrt liegen.

Da die Entwicklungshemmung bedeutend einfacher festzustellen ist als die abtötende Wirkung einer Substanz, letztere aber viel wichtiger erscheint, so wird die Prüfung der Entwicklungshemmung zumeist als Vorprobe in Betracht kommen. Substanzen, welche sich bei dieser Prüfung als sehr wirksam erweisen, werden mit größerer Wahrscheinlichkeit abtötende Kraft besitzen, als solche, die schon im ersten Falle versagen.

Als Testbakterien werden, je nach den Zwecken, welchen ein Desinfektionsmittel dienen soll, verschiedene Arten in Betracht kommen. Viel gebraucht werden Diphtherie-, Typhus- und Kolibazillen, dann aber namentlich Staphylo- und Streptokokken. Die Bakterien verwendet man in 1 oder 2 Tage alter Bouillonkultur.

Ausführung der Prüfung.[1] In einer Reihe steriler Reagenzröhren werden mit sterilem destillierten Wasser Verdünnungen des Desinfiziens hergestellt in steigender Konzentration, z. B. im Verhältnis 1 : 100, 1 : 200, 1 : 300, 1 : 400 usf. Von diesen Verdünnungen wird je 1 *cm*^{3} mit steriler Pipette entnommen und in Röhrchen gegeben, die genau

[1] Nach *K. Laubenheimer*, l. c. S. 4.

9 *cm*³ Bouillon enthalten. Es entsteht also eine weitere, 10fache Verdünnung des Antisepticums, das demnach in der Bouillon in einem Verhältnis 1 : 1000, 1 : 2000 usw. enthalten ist. Nachdem auf die geschilderte Weise die Reihe vorbereitet ist, wird in jedes Röhrchen ein Tropfen der Bouillonkultur der als Testobjekte dienenden Bakterien mittelst steriler Pipette eingebracht. Es wird so erreicht, daß eine annähernd gleiche Zahl von Keimen in der gleichen Menge desselben Nährmediums sich befindet. Als Versuchstemperatur wird die für die betreffenden Bakterien optimale gewählt.

Die Röhrchen werden jeden Tag auf Wachstum untersucht und Entwicklungshemmung dann angenommen, wenn die Bouillon während der Dauer der Beobachtung, welche 8 Tage beträgt, steril, d. h. klar bleibt. Zur Kontrolle dient ein Röhrchen, das nur 10 *cm*³ Bouillon plus einem Tropfen Bakterienkultur enthält.

Diese Methode ist dann gut verwendbar, wenn die zu untersuchenden Desinfektionsmittel mit der Bouillon gemischt keine Trübungen und Niederschläge geben. Ist letzteres der Fall, so können die Resultate hierdurch unrichtig ausfallen und man wird statt Bouillon besser Agar verwenden, der dann zwar voraussichtlich auch durch das betreffende Desinfektionsmittel getrübt werden wird, aber die Trübung wird hier nicht so störend sein, wie in der Bouillon, weil der Nährboden, zu dünner Schicht erstarrt, genügend durchsichtig bleibt, um das Aufgehen der Bakterienkolonien erkennen zu lassen, welche sich in voller Deutlichkeit von dem diffus getrübten Agar abheben.

Die Versuchsanordnung bei dieser Methode ist ähnlich wie die vorstehend beschriebene, nur werden die von dem Desinfiziens hergestellten Verdünnungen in der Menge von 1 *cm*³ nicht in Bouillon, sondern in 9 *cm*³ verflüssigten und auf 42° abgekühlten Agar gegeben. Eine gleichmäßige Verteilung des Antiseptikums im Nährsubstrat wird durch Umrühren mit einer Platinspirale erreicht. Nun erfolgt wieder die Beimpfung der Röhrchen mit je einem Tropfen der Bakterienbouillonkultur und nach nochmaligem gründlichen Vermischen mit der Platinspirale Ausgießen des Agars in Petrischalen. Entwicklungshemmung ist auch hier nur dann anzunehmen, wenn jegliches Bakterienwachstum ausbleibt, d. h. keine Kolonien, auch bei Beobachtung mit der Lupe, sichtbar werden. Das Arbeiten mit Agar ist zwar etwas umständlicher wie mit Bouillon, aber die Beurteilung der Resultate ist leichter.

2. Methoden zur Bestimmung der keimtötenden Kraft chemischer Desinfektionsmittel.

Zur Bestimmung der abtötenden Wirkung von Desinfektionsmitteln sind zahlreiche Methoden ausgearbeitet worden, als deren erste die von *Robert Koch* angegebene „Seidenfadenmethode“ zu nennen ist, welche auch heute noch vielfach Verwendung findet. Das Prinzip dieser Methode

besteht darin, daß sterile, etwa 1 *cm* lange Seidenfäden mit einer Bakterienbouillonkultur getränkt, im Brutschrank getrocknet und dann eine bestimmte Zeit in das zu prüfende Desinfektionsmittel getaucht werden. Verbringt man die Fäden hernach, nach möglichster Entfernung des Desinfektionsmittels, in sterile Bouillon, so läßt sich nach Verlauf eines Tages erkennen, ob die Bakterien abgetötet wurden oder nicht.

Die Verwendung von Seidenfäden hat den großen Nachteil, daß es sehr schwierig ist, die Desinfektionsmittel wieder aus denselben zu entfernen. Die Substanzen werden zum Teil in die Bouillon mit übertragen und können hier Entwicklungshemmung hervorrufen und dadurch Abtötung vortäuschen.

Dieser Übelstand wird vermieden, wenn statt der Seidenfäden mit ihrer porösen Oberfläche z. B. Gummistückchen (*Johnston*) oder Glasfäden (*Buttersack*) verwendet werden, oder, wie in dem Verfahren von *Krönig* und *Paul*, die böhmischen Tariergranaten.

Die Methode von *Krönig* und *Paul* gilt als die exakteste aller bekannten Methoden und soll hier in der von *K. Laubenheimer* etwas vereinfachten Form wiedergegeben werden.

Prinzip der Methode. Schon *M. Gruber*[1]) hatte eine Reihe von Leitsätzen aufgestellt, die bei der Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln zu berücksichtigen sind. Nach *Krönig* und *Paul*[2]) müssen hierbei folgende Bedingungen eingehalten werden.

1. Die für eine vergleichende Versuchsreihe benutzten Bakterien müssen gleiche Widerstandsfähigkeit haben.

2. Die Anzahl der zu den einzelnen Versuchen verwendeten Bakterien muß annähernd die gleiche sein.

3. Die Bakterien müssen in die desinfizierenden Lösungen gebracht werden, ohne daß etwas von dem Nährsubstrat, auf dem sie gezüchtet wurden, mit übertragen wird.

4. Die Desinfektionslösungen müssen während der Einwirkung stets die gleiche Temperatur haben.

5. Nach der Einwirkung der desinfizierenden Mittel müssen die Bakterien wieder möglichst vollständig von diesen befreit werden.

6. Die Bakterien müssen, nachdem sie der Einwirkung der desinfizierenden Lösungen ausgesetzt wurden, auf gleichen Mengen desselben günstigen Nährbodens bei gleicher Temperatur, wenn möglich beim Optimum, zum Wachstum gebracht werden.

7. Die Zahl der noch entwicklungsfähig gebliebenen Bakterien muß nach Ablauf derselben Zeit festgestellt werden. Aus diesem Grunde können nur feste Nährböden benutzt werden.

8. Handelt es sich um wissenschaftliche Untersuchungen, dürfen die Konzentrationen der Lösungen nicht nach Gewichtsprozenten verglichen

[1]) *M. Gruber*, Über die Methoden zur Prüfung von Desinfektionsmitteln. Zentralbl. f. Bakteriologie und Parasitenkunde. Bd. 11. S. 115. (1892.)

[2]) *Th. Paul*, l. c. S. 9.

werden, sondern es müssen äquimolekulare Mengen der betreffenden Stoffe zur Anwendung kommen.

Diesen Postulaten suchten *Krönig* und *Paul* durch folgende Versuchsanordnung gerecht zu werden.[1]) Von den Bakterien wird eine wässerige Aufschwemmung bereitet und diese nach dem Filtrieren, durch das gröbere Teile entfernt werden, an sorgfältig gereinigte Tariergranaten gleicher Größe angetrocknet. Eine gewisse Menge dieser mit Bakterien beschickten Granaten bringt man in die auf einer bestimmten Temperatur gehaltene Desinfektionslösung, nimmt eine bestimmte Anzahl derselben nach verschiedenen passend gewählten Zeitabschnitten heraus und befreit sie durch Behandeln mit geeigneten Chemikalien, die ihrerseits wiederum durch Wasser abgespült werden, vom anhängenden Desinfiziens. Die Granaten werden darauf in Reagenzgläschen mit etwas Wasser geschüttelt, wobei die Bakterien von den Granaten losgesprengt werden. Hierauf mischt man die so erhaltene wässerige Bakterienaufschwemmung mit einem geeigneten, festwerdenden Nährboden, gießt in Petrischalen aus und stellt nach gewissen Zeitabschnitten die Zahl der bei einer bestimmten Temperatur entwickelten Kolonien fest.

Als Testbakterien werden von Dauerformen die durch *R. Koch* in die Desinfektionstechnik eingeführten Milzbrandsporen und von vegetativen Formen Staphylokokken zumeist verwandt, und zwar am besten der resistente Staphylococcus pyogenes aureus.

Ausführung der Prüfung. Böhmische Tariergranaten werden durch einen Satz von zwei Sieben sortiert, und solche ausgesucht, die einen Durchmesser von 1·5—2 *mm* haben. Auf die absolute Größe der Granaten kommt es hierbei nicht an, sondern nur darauf, daß alle Granaten von gleicher Größe sind. Diese werden sorgfältig von anderweitigen Beimengungen befreit und dann dreimal mit auf 1 : 3 verdünnter roher Salzsäure gekocht. Die Säure wird durch gründliches Spülen zuerst mit gewöhnlichem, dann mit destilliertem Wasser entfernt. Es folgt eine Waschung mit absolutem Alkohol, mit Äther und wieder mit absolutem Alkohol und zum Schlusse ein nochmaliges Abspülen mit destilliertem Wasser. Die so gereinigten Granaten werden, vor Staub geschützt, getrocknet und schließlich im Heißluftschrank sterilisiert. Sie sind nunmehr zur Aufnahme der Keime bereit.

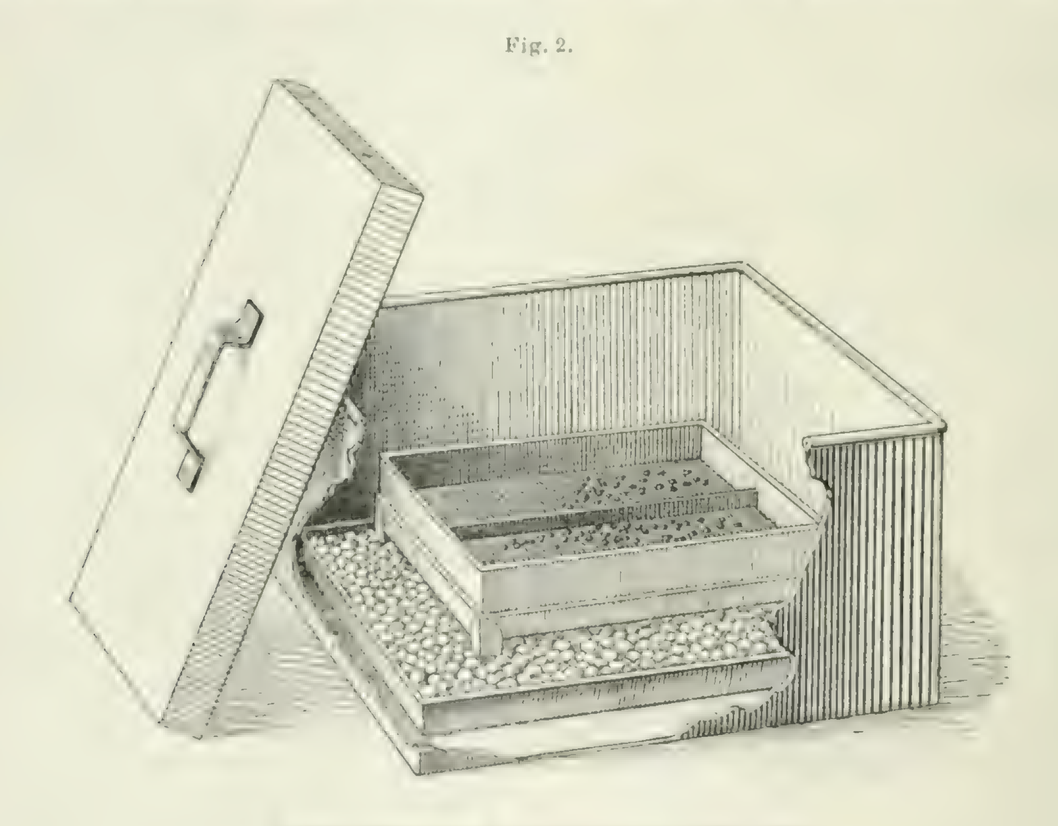
Die Staphylokokkenkulturen verwendet man, nachdem sie 1—2 Tage im Brutschrank bei zirka 37·5° gestanden haben. Die Milzbrandkulturen, zu deren Anlegung man am besten eine frische, aus der Milz einer unmittelbar vorher an Milzbrand gestorbenen Maus gewonnene Reinkultur benutzt, hält man drei Tage lang bei zirka 24° C, um die Bildung von Sporen zu veranlassen. Die Zubereitung der Bakterienemulsion geschieht in folgender Weise. Von einer gut gewachsenen Schrägagarkultur wird der Bakterienbelag in 16 cm^3 sterile physiologische Kochsalzlösung aufgenommen

[1]) *Th. Paul*, l. c. S. 10.

und diese Aufschwemmung durch ein steriles doppeltes Faltenfilter filtriert, um gröbere Partikelchen zurückzuhalten und die Keime möglichst zu isolieren. Diese Suspension kommt mit 20 *g* der gereinigten Granaten in ein Erlenmeyerkölbchen und wird mit denselben gründlich geschüttelt. Die übrige Flüssigkeit wird abgegossen und die Granaten in einen Trichter gebracht, dessen Hals mit einem kleinen, losen Wattepfropf verschlossen ist. Man läßt gut abtropfen.

Die vollständige Trocknung erfolgt in dem von *Krönig* und *Paul* angegebenen sterilisierbaren Trockenkasten[1] (Fig. 2). Dieser Kasten besteht aus einem inneren rechteckigen flachen Kasten aus Nickelblech von 28 *cm* Länge, 17 *cm* Breite und 9 *cm* Tiefe, der mit einem Siebboden

Fig. 2.



Trockenkasten von *Krönig* und *Paul*. (Nach *Paul*.)

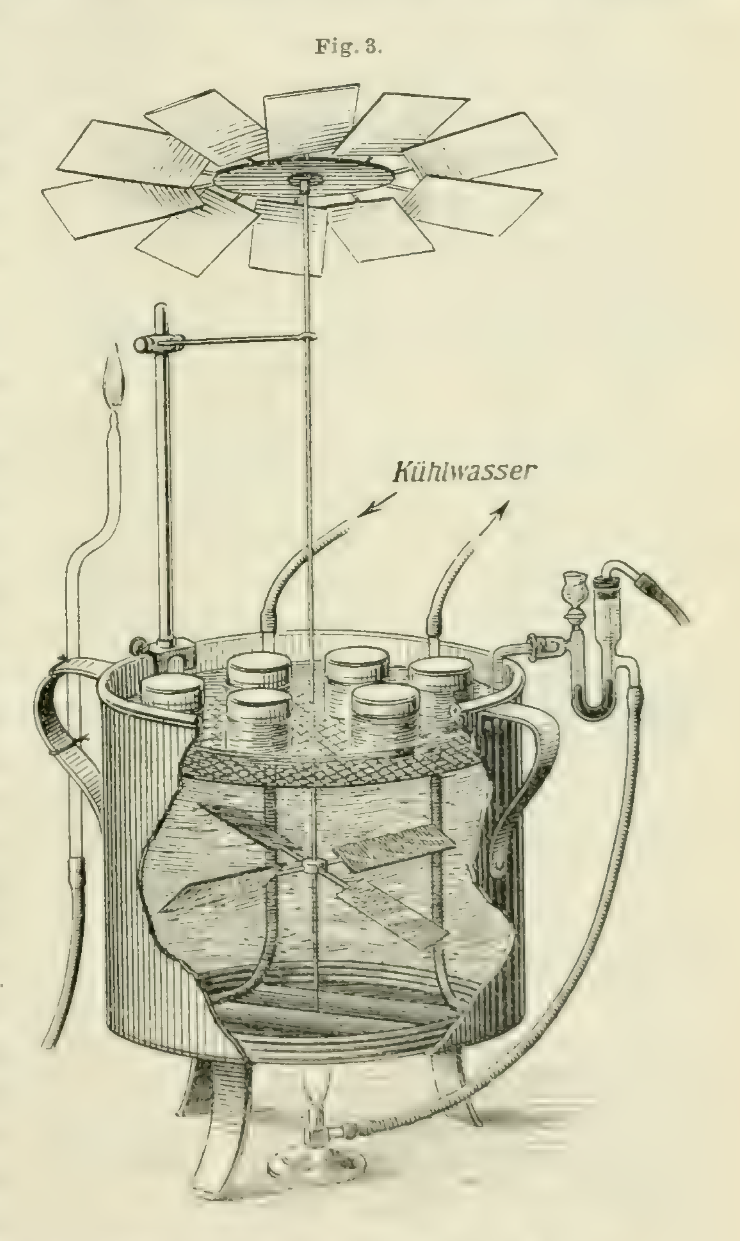
aus Nickeldrahtnetz versehen ist und zur Aufnahme der Granaten dient. Um gleichzeitig zwei verschiedene Sorten von Granaten trocknen zu können, ist der Kasten der Länge nach in zwei Abteilungen geteilt. Dieser Kasten steht innerhalb eines geräumigen, mit gut schließendem Überfangdeckel versehenen Blechgefäßes aus Zink in einer flachen Schale mit gekörntem, entwässertem Chlorcalcium. Zum Trocknen der Granaten, was etwa 12 Stunden in Anspruch nimmt, wird der Kasten in den Eisschrank gestellt. Bei der niederen Temperatur und vor Licht geschützt behalten die Milzbrandsporen ziemlich lange ihre Widerstandsfähigkeit gegen Desinfi-

[1]) Trockenkasten (M. 55), Thermostat (M. 65), Platinsiebe (zirka M. 12) etc. sind von der Firma *Dr. H. Rohrbeck Nachfolger*, Berlin NW., Karlstraße 20 a zu beziehen.

zientien; erst allmählich geht diese zurück und nach Ablauf mehrerer Monate beträgt sie nur noch einen Bruchteil der ursprünglichen. Die mit Staphylokokken beschickten Granaten müssen. trotz der Aufbewahrung im Eisschrank, innerhalb weniger Tage aufgebraucht werden.

Die in dieser Weise hergestellten Granaten können jetzt den Desinfektionsmitteln ausgesetzt werden. Die Desinfektionsmittel selbst befinden sich in der Menge von 20 *cm*³ in kleinen Glasdosen mit übergreifendem Deckel, die zur Erlangung einer gleichmäßigen Temperatur der Lösungen auf das Drahtnetz eines *Ostwald*schen Thermostaten (Fig. 3) gestellt werden.

Fig. 3.



Thermostat nach *Wilh. Ostwald*. (Nach *Paul*.)

Wie schon früher erwähnt, wird die Wirkung von Desinfektionsmitteln sehr wesentlich durch die Temperatur beeinflußt, bei welcher die Versuche ausgeführt werden, und man wird nur dann unter sich vergleichbare Resultate erhalten, wenn bei allen Untersuchungen gleiche Temperaturen eingehalten werden. Da die meisten Desinfektionsprozesse bei Zimmertemperatur vor sich gehen, wählt man zweckmäßig 18° als Temperatur der Desinfektionslösungen. Um auch im Sommer, wenn die Temperatur in den Laboratorien höher steigt, unter gleichen Bedingungen arbeiten zu können, befindet sich unter dem Drahtnetz des Thermostaten, das die Schälchen mit den Desinfektionsmitteln trägt, eine Kühlschlange aus Bleirohr, die an die Wasserleitung angeschlossen werden kann, so daß in ihr ständig kühles Wasser zirkuliert. Ein durch eine Gasflamme getriebenes Rührwerk sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der Wärme in dem Wasserbade.

Nach etwa einer halben Stunde haben die Desinfizientien in dem Thermostaten die Temperatur von 18° angenommen und werden nunmehr mit den Testobjekten beschickt.

Man entnimmt zu diesem Zwecke dem Trockenkasten eine Anzahl der Granaten mit einer vorher ausgeglühten Pinzette mit Platinarmen und bringt sie auf ein kleines Platinsiebchen (Fig. 4), von dem sie alle gleichzeitig in die Desinfektionslösung geschüttet werden. Für jede zu gießende Agarschale werden 5 Granaten benötigt. In dem Desinfiziens steht ein zweites Platinsiebchen, auf das die Granaten einzeln unter der Flüssigkeit mit steriler Pinzette aufgelegt werden. Wollte man die Granaten auf dem ersten Platinsiebchen liegend direkt in die Lösungen bringen, so würden sich kleine Luftbläschen, die den Granaten anhaften, nicht vermeiden lassen. Eine gleichmäßige Benetzung der angetrockneten Keime mit den Desinfizientien würde aber dadurch verhindert.

Nach bestimmten Zeiten werden die Platinsiebchen mit den Granaten herausgenommen und in ein Schälchen mit sterilem Wasser gebracht, um so den größten Teil des anhaftenden Desinfiziens zu entfernen. Die eigentliche Unschädlichmachung des Desinfektionsmittels erfolgt in einer zweiten Reihe von Schalen, welche das zu diesem Zwecke geeignete Reagens enthalten, das seinerseits durch nochmaliges 10 Minuten dauerndes Waschen mit destilliertem Wasser zu entfernen ist. Der vorstehend geschilderte Waschprozeß muß mit ganz besonderer Sorgfalt ausgeführt werden, da bei allen Desinfektionsversuchen eine Hauptschwierigkeit darin besteht, nach Ablauf der gewünschten Zeit die weitere Einwirkung des Desinfiziens möglichst schnell aufzuheben und zu verhindern, daß Spuren des Mittels auf die Nährböden mit übertragen werden, wo sie entwicklungshemmend wirken können.

Fig. 4.



Platinsiebchen. Nat. Größe. (Nach *Paul*.)

Während es *Geppert*[1]) gelang, Sublimat durch Schwefelammon zu fällen und es so in eine für Mikroorganismen unschädliche Verbindung überzuführen, ist gerade für die in der Praxis wichtigsten Substanzen, Phenole und Kresole, kein Mittel bekannt, das sie in ihrer Wirkung zu neutralisieren vermöchte. Am meisten eignen sich zur Entfernung des Phenols und seiner Derivate verdünnte Alkalien, wie Ammoniak, Natron- oder Kalilauge, eine Methode, die auch von *Krönig* und *Paul* empfohlen wird. Nach *Laubenheimer* aber gelingt es schon durch einfaches Wässern der Granaten, sowohl Desinfektionsmittel aus der Phenolreihe, wie auch Sublimat vollständig zu entfernen, und so ein besonderes Reagens zu ihrer Neutralisation entbehrlich zu machen. Das Wässern gestaltet sich nach genanntem Autor folgendermaßen:

Die Granaten werden auf dem Platinsiebchen aus der Desinfektionslösung nach der beabsichtigten Zeit herausgenommen und auf dem Sieb liegend für etwa eine halbe Minute in einer 2 *cm* hohen Petrischale durch

[1]) *Geppert*, Zur Lehre von den Antisepticis. Berliner klin. Wochenschr. 1889. S. 789.

Hin- und Herbewegen mit etwa 50 cm^3 sterilem destillierten Wasser oberflächlich abgespült. Darauf kommen sie in eine zweite Schale mit 50 cm^3 Waschwasser, worin sie 5 Minuten verweilen. Schließlich werden sie einzeln mit steriler Pinzette in eine dritte Schale, die ebenfalls 50 cm^3 steriles Wasser enthält, eingelegt; hier bleiben sie nochmals 10 Minuten. Damit ist der Waschprozeß, der ungefähr 15 Minuten dauert, beendet. In der ersten Schale wird schon die Hauptmenge des Desinfiziens entfernt. Hier läßt man die Granaten aber nur ganz kurz, um eine Nachwirkung der wenn auch schon stark verdünnten Substanzen nicht aufkommen zu lassen. Die letzten Reste werden durch die zweite und dritte Waschung entfernt, wobei Sorge zu tragen ist, daß die Granaten in den Schalen möglichst isoliert liegen und daß sie ferner stets von frischem Wasser umspült werden, was durch vorsichtiges Bewegen der Schalen leicht zu erreichen ist.

Nachdem die Granaten so behandelt, werden sie mit steriler Pinzette zu je 5 Stück in Reagenzröhrchen übertragen, die 3 cm^3 steriles Wasser enthalten. Die so mit Granaten beschickten Röhrchen werden serienweise, zu je 6—9 Stück, in der Hand kräftig geschüttelt, um die anhaftenden Keime abzulösen und in das Schüttelwasser überzuführen. Dabei ist darauf zu achten, daß nicht etwa Wassertröpfchen an den Wattepfropf gelangen, wodurch viele Keime der Untersuchung entzogen werden könnten. Die in dem Wasser suspendierten Keime können nunmehr auf das Nährsubstrat übertragen werden, um die noch lebensfähigen Individuen zur Entwicklung zu bringen. Um aber den Vorgang der Abtötung von Bakterien durch ein Desinfiziens quantitativ verfolgen zu können, müssen die noch vermehrungsfähigen Keime gezählt werden, was nur mit Hilfe fester Nährböden möglich ist. Hierbei kommt in erster Linie Nähragar in Betracht, da nach Einwirkung der Desinfektionsmittel die Mikroorganismen bei optimalen Temperaturen, also meist bei 37°, gehalten werden sollen. Zu empfehlen ist ein 2%iger Agarnährboden, aus bestem Rindfleisch hergestellt. Von dem verflüssigten und auf 42° abgekühlten Agar werden 12 cm^3 in die Röhrchen gegeben, welche die von den Granaten abgeschüttelten Keime enthalten. Dabei müssen die Röhrchen während des Zugießens des Agars ständig um ihre Längsachse gedreht werden, damit von dem herabfließenden Nährboden die Innenwände vollständig bespült und alle keimhaltigen Wassertröpfchen aufgenommen werden. Mit einer Platinspirale wird dann der Agar und das Schüttelwasser mit den abgelösten Keimen vermischt und in Petrischalen ausgegossen. Es ist notwendig, von den nach den einzelnen Einwirkungszeiten hergestellten Proben mehrere Kulturen anzulegen und aus der oft schwankenden Zahl der aufgegangenen Kolonien das Mittel zu ziehen. Drei Proben genügen nach *Laubenheimer*.

Nach einer dreitägigen Bebrütungszeit der Platten erfolgt die Auszählung der zur Entwicklung gelangten Kolonien, d. h. es wird festgestellt, wie viele Keime nach bestimmter Einwirkungszeit des Desinfiziens noch vermehrungsfähig geblieben sind. Die Platten länger wie 3 Tage im Brutschrank zu lassen ist nicht nötig.

Will man an Stelle von Staphylokokken und Milzbrand andere pathogene Bakterien, z. B. Diphtheriebazillen oder Streptokokken, zu den Prüfungen verwenden, so ist die Granatenmethode nach *H. Bechhold*[1]) nicht brauchbar, da diese Bakterien durch das Austrocknen stark geschädigt werden. Über eine Methode, welche in diesem Falle benutzt werden kann, vgl. *H. Bechhold* und *P. Ehrlich*[2]) und *H. Bechhold*.[3]) Zur Prüfung von Wundstreupulvern als Ersatzmittel für das Jodoform kann eine von *B. Heile*[4]) angegebene Methode Verwendung finden.

Protozoen.

Die, wie die Bakterien, einzelligen Protozoen werden von der zoologischen Systematik an den Anfang der Tierreihe gestellt. Als parasitäre Erreger zahlreicher Krankheiten, darunter der Malaria, der tropischen Schlafkrankheit und der Syphilis, besitzen sie hohe medizinische Bedeutung.

Die pathogenen Protozoen unterscheiden sich von den pathogenen Bakterien biologisch vor allem dadurch, daß sie eine viel geringere Resistenz äußeren Faktoren gegenüber als letztere besitzen. Dies bedingt, daß eine Kultur derselben außerhalb des Tierkörpers bisher nicht gelungen ist, damit hängt aber auch zusammen, daß Wertbestimmungen chemischer Mittel zu ihrer Abtötung außerhalb des Tierkörpers nicht die praktische Bedeutung zukommt, wie bei den Bakterien, da Übertragung der Parasiten durch Wasser, Gebrauchsgegenstände etc. kaum vorkommt. Mit der geringen Widerstandsfähigkeit der pathogenen Protozoen gegenüber Veränderungen ihres chemischen Milieus hängt auch zusammen, daß bei ihnen, im Gegensatz zu den Bakterien, eine Abtötung im tierischen Organismus durch Arzneimittel unter günstigen Bedingungen gelingt, wie dies seit langer Zeit von der Malaria durch Chinin, von der Syphilis durch Quecksilber bekannt ist, Gifte, denen sich die Arsenpräparate in ihren Wirkungen anreihen.

Auf die bekannten „chemotherapeutischen" Untersuchungen von *Ehrlich* und seinen Schülern zur Auffindung praktisch brauchbarer organischer Arsenverbindungen für die Bekämpfung der Schlafkrankheit, der Syphilis und anderer Protozoenerkrankungen von Mensch und Tieren kann hier nicht eingegangen werden. Hinsichtlich der Methodik der Wert-

---

[1]) *H. Bechhold*, Desinfektionsmittel und ihre Prüfung. Zeitschr. f. angewandte Chemie. Bd. 22. S. 2033 (1909).

[2]) *H. Bechhold* und *P. Ehrlich*, Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Desinfektionswirkung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 47. S. 177 (1906).

[3]) *H. Bechhold*, Halbspezifische chemische Desinfektionsmittel. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. 64. S. 113 (1909).

[4]) *B. Heile*, Experimentelle Prüfung neuer Antiseptica. Sammlung klin. Vorträge (*Volkmann*). N. F. Nr. 388. Leipzig 1905.

bestimmung derartiger Substanzen im Tierversuch sei auf die einschlägige Literatur[1]) verwiesen.

An dieser Stelle sollen lediglich die einfach auszuführenden Prüfungen an leicht zugänglichen und kultivierbaren Protozoen besprochen werden. Als solche kommen Süßwasserinfusorien und von diesen in erster Linie „Paramäcien" in Betracht. Derartige an Infusorien angestellte Versuche besitzen wenigstens als Vorproben für die Prüfung an pathogenen Formen einige Bedeutung, insofern viele Gifte, wie das Chinin, die arsenige Säure und die Quecksilbersalze, sich auch hier als sehr wirksam erweisen.

Die Herstellung einer „Paramäcienkultur" kann nach *R. Hertwig*[2]) in folgender Weise geschehen. Teilstücke der Kiemen und des Fußes der Teichmuschel (Anodonta) werden ins Wasser gelegt, worauf sich nach einigen Tagen Paramäcien am Wasserrande oben ansammeln. Diese überträgt man mit gut gereinigter Pipette in etwa 10 *l* haltende Flaschen, die als Zuchtgefäße mit stark geschütteltem, altem, ausgefaultem Teichwasser gefüllt sind und hängt darein an einer Schnur ein Gazebeutelchen mit zerkleinerten Salatblättern. Das Gazebeutelchen mit den Blättern verbringt man vor dem Einhängen für einige Zeit in kochendes Wasser. Bald entwickeln sich in der Flasche zahlreiche Fäulnisbakterien, die den Paramäcien zur Nahrung dienen. Die Salatblätter muß man etwa alle 4—6 Wochen wechseln. Namentlich in den Wintermonaten gelingt das Anlegen einer solchen Kultur schlecht. Man verschafft sich dann am besten Impfmaterial aus einem zoologischen Universitätsinstitut. Eine gute Kultur kann sich jahrelang halten. Man entnimmt die Tiere von der Oberfläche der Flüssigkeit.

Aus Heuaufgüssen (Heu, das man mit Leitungswasser übergießt und vor Staub geschützt faulen läßt) bekommt man gewöhnlich nicht die großen Paramäcien, sondern kleinere Formen, meist Colpidien.

Die häufig vorkommenden Paramäcienformen sind Paramaecium Aurelia und P. caudatum. Fig. 5 zeigt, einer Arbeit von *H. Korentschewsky*[3]) entnommen, Paramaecium caudatum, und zwar *A* und *B* in normalem Zustande, *C*—*F* nach Vergiftung. Die Länge des Tieres beträgt 0·1—0·3 *mm*. Eine Vertiefung in dem Tiere, die den Zugang zur Mundöffnung *(b)* darstellt, heißt Peristomum *(p)*. Vom Munde *(b)* aus führt das Schlundrohr *(f)* zu einer Nahrungsvakuole *(d)*, wohin die aufgenommene Nahrung (Bakterien) gelangt. Nachdem diese Nahrungsvakuole eine gewisse

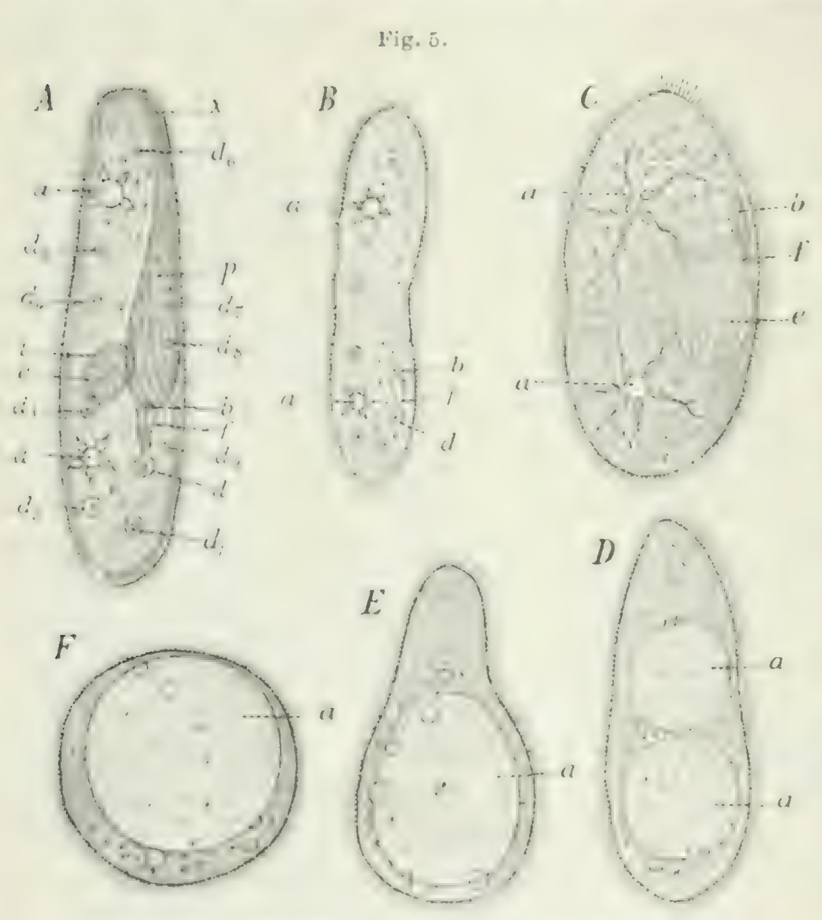
[1]) *Kisskalt* und *Hartmann*, Praktikum der Bakteriologie und Protozoologie. T. II. Jena 1910. — *O. Neven*, Über die Wirkungsweise der Arzneimittel bei Trypanosomiasis. Dissertat. Gießen 1909. — *J. Morgenroth* und *L. Halberstaedter*, Über die Beeinflussung der experimentellen Trypanosomeninfektion durch Chinin. Sitzungsber. d. K. preuß. Akademie d. Wissensch. Physikal.-mathemat. Klasse, 1910. S. 732. — *P. Ehrlich* und *S. Hata*, Die experimentelle Chemotherapie der Spirillosen. Berlin 1910.

[2]) Zitiert nach *S. v. Prowacek*, Taschenbuch der mikroskopischen Technik der Protistenuntersuchung. Leipzig 1909. S. 70. 2. Aufl.

[3]) *W. Korentschewsky*, Vergleichende pharmakologische Untersuchungen über die Wirkung von Giften auf einzellige Organismen. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **49**. S. 7 (1903).

Größe erreicht hat, löst sie sich vom Schlund ab und vollführt ihren Kreislauf im Körper der Infusorie (d_1—d_8), wobei die Nahrung allmählich verdaut und aufgesogen wird. An Stelle der abgegangenen Vakuole bildet sich eine neue. Das Fortführen des Wassers, der löslichen Extraktivstoffe etc. wird mittelst zweier pulsierender Vakuolen (*a*) bewerkstelligt. Die Flüssigkeit sammelt sich in denselben durch Vermittlung von 8 Bildungsvakuolen an. Das Pulsieren geschieht rhythmisch, in regelmäßigen Zeitzwischenräumen und ist abhängig von der Temperatur, vom Sauerstoff des Wassers und von vielen anderen Einflüssen auf die Infusorie. Das ganze Tier ist von einer festeren Ectoplasmaschicht bedeckt. Unter dieser befinden sich nadelartige Bildungen, Trichozysten (*x*) genannt, die auf Reizung hervorgestreckt werden. Im Protoplasma liegt außerdem der Macronucleus (*e*) und der Micronucleus (*i*).

Fig. 5.



Paramaecium caudatum. *A* Normal, Vergr. 230. *B* Normal; halbschematisch, Vergr. 130. *C*—*F* in gleicher Vergr. mit *B* vergleichbar. *C* Nach Alkaliwirkung. *D*—*F* Nach Coffeinwirkung. (Nach *Korentschewsky*.)

Fig. 5 *C* zeigt ein Tier nach der Einwirkung einer verdünnten Natronlauge (**1:5000—1:7000**), welche nicht mehr tödlich wirkt, sondern nur Quellung und Klärung des Protoplasmas zur Folge hat. Fig. *D*—*F* zeigt die Einwirkung von freiem Coffein. Durch das Coffein wird (am besten in einer Konzentration **1:1400**) vor allem eine Veränderung der pulsierenden Vakuolen hervorgebracht. Das Pulsieren wird langsamer und hört schließlich ganz auf. Die Vakuolen vergrößern sich zugleich mehr und mehr, vereinigen sich schließlich und das Tier nimmt Kugelform an. Trotz dieser starken anatomischen Veränderung können sich solche Tiere noch lebhaft bewegen und werden durch die genannte Konzentration nicht getötet. Das Coffein ist überhaupt für Paramäcien auffallend wenig giftig.

Meist wird man in quantitativen Versuchen an Protozoen davon absehen, die genaueren anatomischen Veränderungen der Tiere zu verfolgen, sondern sich damit begnügen, die tödlichen Grenzdosen der Gifte

festzustellen. Dies geschieht am besten durch Prüfung auf dem Objektträger „im hängenden Tropfen“ (in einer kleinen feuchten Kammer), wobei man je einen Tropfen Protozoenkultur und zu prüfende Lösung vermischt. Genaue wirksame Grenzdosen festzustellen ist häufig nicht möglich, da einzelne Individuen in einer Probe sich als viel widerstandsfähiger erweisen, wie andere. Beim Tode der Infusorien beobachtet man unter dem Mikroskop ein Zerfließen und Platzen derselben und als totes Tier bleibt nur noch ein leeres Gebilde zurück, das von *Neuhaus*[1]) als „Schatten“ bezeichnet wird, da es an die Blutkörperchenschatten erinnert.

Wie durch derartige Versuche an Infusorien Resultate erhalten werden können, die den Verhältnissen bei pathogenen Protozoen entsprechen, zeigen die bekannten Untersuchungen von *Binz*[2]) über die Wirkung des Chinins. Noch Lösungen **1:50000** des salzsauren Salzes lähmen Paramäcien nach einigen Stunden, während Lösungen von **1:5000** innerhalb 25—30 Minuten den Tod der Tiere herbeiführen. Salzsaures Cinchonin und Cinchonidin erweisen sich dagegen mehrfach schwächer wirksam, was auch ihrer geringeren antipyretischen Kraft entspricht.

Daß aber derartige Versuche auch andere Resultate ergeben können als die Prüfungen am kranken Tier und Menschen, lehren die Untersuchungen von *Tappeiner*[3]) und seinen Schülern. Von diesen Untersuchern waren Derivate des Chinolins und Acridins aufgefunden worden, die im Paramäcienversuch bedeutend stärker als Chinin wirkten, sich aber bei der Behandlung von Malariafällen als unwirksam erwiesen.

Blut.

Frisches („lebendfrisches“) Blut verschiedener Tiere findet sowohl zum qualitativen Nachweis von Giften, wie auch zur quantitativen Bestimmung derselben Verwendung auf Grund mehrerer ihm zukommender Eigenschaften.

Das aus dem Blutgefäße ausfließende Blut gerinnt je nach der Tierart mehr oder weniger rasch meist schon nach einigen Minuten. Äußere Umstände können die Gerinnung beschleunigen oder hemmen. Bei der Gerinnung, welche unter chemischer Beteiligung von Kalksalzen erfolgt, verwandelt sich das im Blutplasma gelöste Fibrinogen in Fibrin.

[1]) *H. Neuhaus*, Versuche über Gewöhnung an Arsen, Antimon, Quecksilber und Kupfer bei Infusorien. Arch. internation. de Pharmacodyn. et de Thérap. T. **20**. p. 398 (1910).

[2]) Vgl. *C. Binz*, Vorlesungen über Pharmakologie. 2. Aufl. S. 552 und ferner *G. Grethe*, Über die Wirkung verschiedener Chininderivate auf Infusorien. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **56**. S. 189 (1896).

[3]) *H. Tappeiner*, Über die Wirkung der Phenylchinoline und Phosphine auf niedere Organismen. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **56**. S. 369 (1896). — *A. Jodlbauer*, Über die Wirkungen des γ-Phenylchinaldins und des Methylphosphins. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **59**. S. 154 (1897). — *J. Mannaberg*, Über die Wirkungen von Chininderivaten und Phosphinen bei Malariafiebern. Ibid. S. 185.

Blutegelextrakt (Hirudin) oder Salze, die Kalk fällen, wie Ammoniumoxalat oder Natriumcitrat verhindern die Gerinnung, letztere Salze, wenn sie in Menge von 0·2 (Oxalat) bis 0·4% (Citrat) im Blute enthalten sind. Kälte verzögert die Gerinnung. Beschleunigt wird sie durch Rühren oder Schlagen. Rührt man das aus einem Blutgefäße entnommene Blut mit einem Glasstabe kräftig um, so setzt sich das Fibrin an demselben in Fäden ab und kann durch Auswaschen mit Wasser gereinigt werden. Das „defibrinierte" Blut ist zu den nachstehend angegebenen Versuchsmethoden brauchbar.

Man verwendet am häufigsten zu den Prüfungen aus dem Schlachthause bezogenes, möglichst frisches (nicht etwa durch Kochsalzzusatz konserviertes) Rinderblut, das sich kalt (im Eisschrank) aufbewahrt, 2 bis 3 Tage brauchbar erhält. Vor der Verwendung koliert man das Blut durch ein mit 0·9%iger (sogenannter physiologischer) Kochsalzlösung angefeuchtetes Tuch, auf dem noch etwa vorhandene Fibrinflocken zurückbleiben. Stellt man das Blut in einem hohen Zylinder in den Eisschrank, so trennt es sich langsam in zwei Schichten: einen oberen gelben dünnflüssigen Teil, das Serum und einen unteren dickflüssigen, die roten Blutkörperchen. Ist das Serum stark rot gefärbt, so ist das Blut entweder nicht mehr frisch oder es hat Wasser oder sonst ein Zusatz eine teilweise Auflösung der Blutkörperchen veranlaßt. Eine raschere Trennung von Serum und Blutkörperchen, als diese spontane, erreicht man durch Zentrifugieren. Um „gewaschene" Blutkörperchen zu erhalten, hebert man nach dem Zentrifugieren das Serum ab und ersetzt es durch 0·9%ige Kochsalzlösung. Man schüttelt durch (zu starkes Schütteln schädigt die Blutkörperchen mechanisch!), zentrifugiert von neuem und wiederholt dies 2—3mal.

Von anderen Blutarten kommt hier noch das von Kaninchen und Meerschweinchen in Betracht.

Kaninchenblut entnimmt man ohne Schädigung des Tieres in Mengen bis zu 5 und 10 cm^3 aus einer Ohrvene. Dazu eignen sich langohrige Tiere besser als kurzohrige. Etwas unterhalb der Mitte des einen Ohres klemmt man am äußeren Rande eine Arterienklemme fest, um venöse Stauung herbeizuführen. Ein Gehilfe hält dann das Tier mit beiden Händen am Kopf, eine Hand über die Augen legend, die andere am Hinterkopf. Mit dem Arm dieser zweiten Hand hält er das Tier gegen seinen Körper angedrückt fest. Man entfernt mit einer Schere die Haare an einer Stelle der gestauten und stark hervortretenden Vene und wäscht diese Ohrgegend mit einem in 2%ige Natriumcitratlösung getränkten Wattebausch ab. Das Blut entnimmt man mit einer Injektionsspritze (Rekordspritze) von 2 oder 5 cm^3 (Fig. 6), welche man mit 2%iger Natriumcitratlösung ausgespritzt hat (um Gerinnung bei der Blutentnahme zu vermeiden). Man sticht mit der scharfen und nicht zu engen Nadel in die gestaute Vene parallel zu dieser und gegen den Blutstrom (also nach der Ohrspitze zu) (Fig. 7) die Nadel der leeren Spritze ein und zieht den Stempel derselben langsam zurück. Ist man im Lumen der Vene, so füllt sich dabei die Spritze mit

Blut. Ist dies geschehen, so entleert man den Spritzeninhalt in einen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespülten Meßzylinder mit Stöpsel und schüttelt hier mit einigen Glasperlen, um Gerinnung herbeizuführen, durch. Man verdünnt dann mit physiologischer Kochsalzlösung bis auf das gewünschte Volumen und filtriert durch einen losen Wattebausch vom Fibrin ab. Nach Herausnahme der Spritzennadel aus der Ohrvene kann man die Klemme, welche zur Stauung der Vene diente, nunmehr an der Einstichstelle für einige Zeit anbringen, um weitere Blutung zu verhindern. Stärkere Blutfüllung am Kaninchenohr und besseres Fließen des Blutes erzielt man durch Abwaschen des Ohres mit einem mit Toluol oder Xylol getränkten Wattebausch.

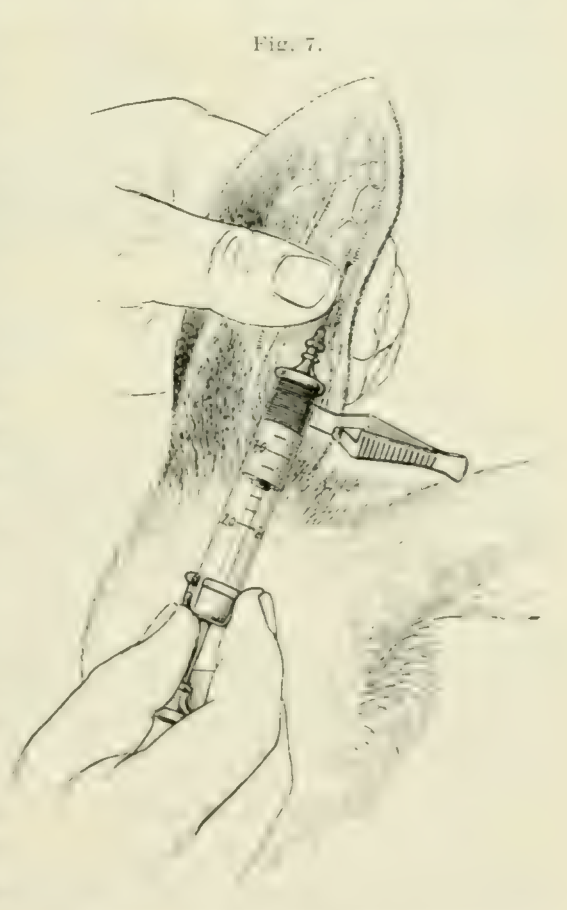
Fig. 6.



Rekordspritze.

Braucht man größere Blutmengen, so entnimmt man diese am besten aus einer in Äther- oder Urethannarkose des Tieres freigelegten[1]) Halsarterie (Carotis). Man präpariert diese in möglichster Ausdehnung frei, legt dann zwei Ligaturen möglichst weit oben (kopfwärts) in $1/_2$ *cm* Entfernung voneinander an und schneidet zwischen beiden Ligaturen das Gefäß durch. Man legt dann das freibewegliche Gefäßende in einen Zylinder mit Glasstöpsel und schneidet es nahe der Ligatur an. Das Blut spritzt in starkem Strahl in das Gefäß. Durch Kompression des Bauches und Herzmassage kann man die ausfließende Blutmenge noch etwas vermehren. Von mittelgroßen Kaninchen lassen sich 80—100 *cm*³ Blut gewinnen.

Fig. 7.



Blutentnahme aus dem Kaninchenohr.

Meerschweinchenblut kann man, ohne das Tier zu schädigen, in Mengen von 2—5 *cm*³ direkt aus dem Herzen mit der Spritze entnehmen. Hierzu spannt man ein großes Tier auf einem Brette auf, durch

[1]) Präparation siehe bei *R. F. Fuchs*, Physiologisches Praktikum für Mediziner. Wiesbaden 1906. S. 62.

Festbinden an den Beinen und Fixieren des Kopfes. Dann wird der Thorax zur Orientierung über den Herzschlag abgetastet und auf der linken Seite geschoren. Nach Entfernung der Haare kann die Haut etwas gewaschen werden. Mit einer Rekordspritze mit weiter scharfer Nadel sticht man in der Herzgegend auf der linken Seite des Brustbeins zwischen den Rippen ein und zieht den Stempel an. Kommt kein Blut, so zieht man die Spritze wieder heraus und macht an anderer Stelle einen neuen Einstich. Bei gutem Gelingen der Blutentnahme erholt sich das Tier rasch nach dem Losbinden von dem Brett und kann nach längerer Zeit von neuem punktiert werden. Will man das Tier ganz entbluten, so geschieht dies durch Einschnitt in den Hals und Abwärtshalten. Ein großes Tier hat bis zu 14 *cm*³ Blut.

Zur biologischen Charakterisierung von Giften finden zwei Eigenschaften des Blutes Verwendung:

1. diejenige, daß die roten Blutkörperchen durch viele Agenzien derart geschädigt werden, daß die den roten Inhalt bildende Hämoglobinlösung austritt, ein Vorgang, welcher Hämolyse *(Hamburger)* genannt wird.

2. diejenige, daß die roten Blutkörperchen durch manche Gifte zusammengeballt, verklebt werden, eine Erscheinung, die man als Agglutination oder Konglutination bezeichnet.

1. Hämolyse.

Das normale Blut ist auch in dünner Schicht undurchsichtig, „deckfarben“; durch die Auflösung der Blutkörperchen wird es vollkommen klar und durchsichtig, „lackfarben“. Die Aufhellung der undurchsichtigen Blutschicht, das Durchsichtigwerden, ist das Kennzeichen der eingetretenen Hämolyse.

Abgesehen von mechanischen Einwirkungen (Zerreiben mit Sand) oder Temperaturwechsel (Gefrieren und Wiederauftauen, Erwärmen auf 60—70°) kann Hämolyse herbeigeführt werden durch folgende Substanzen: 1. Wasser. 2. Säuren und Basen. 3. Fettlösende Substanzen. 4. Spezifische Blutgifte.

Die roten Blutkörperchen sind kleine mit Flüssigkeit gefüllte Säckchen. Sie besitzen eine semipermeable Hülle, welche zum Teil eiweiß-, zum Teil fettartiger Natur (Lipoide: Cholesterin, Lecithin) ist. Der Inhalt der Blutkörperchen ist beim höheren Wirbeltiere mit einer Lösung von etwa 0·9% Kochsalz oder einer solchen von 8·5% Rohrzucker „isotonisch“. In derartiger Lösung werden Blutkörperchen, z. B. des Rindes, weder schrumpfen (durch Austritt von Wasser durch die semipermeable Hülle), noch an Volumen zunehmen (durch Wasseraufnahme). Schrumpfung der Blutkörperchen, welche hierbei sogenannte Stechapfelform annehmen, findet statt in mehrprozentigen „hyperisotonischen“ Salzlösungen, Volumzunahme in „hypoisotonischen“ Lösungen, z. B. von 0·6% NaCl. Wird die Salzlösung, in welche die Rinderblutkörperchen gebracht werden, noch weiter ver-

dünnt, so ist ihre Volumzunahme eine derartig starke, daß die Hülle gesprengt wird, also Hämolyse eintritt. Manche Blutarten, z. B. Hundeblut, sind gegenüber Verminderung des osmotischen Druckes viel empfindlicher als Rinderblut.

Mit Froschblutkörperchen ist eine 0·6%ige Lösung von NaCl im osmotischen Gleichgewicht.

Die Hämolyse durch Alkalien und Säuren ist in erster Linie auf das Vorhandensein freier OH- und H-Ionen zurückzuführen. Doch nicht ausschließlich. Lösungen organischer Säuren und Alkalien wirken stärker hämolytisch, als man nach ihrer Ionenkonzentration erwarten sollte (*Fühner* und *Neubauer*[1]). Hämolyse durch Kaliumhydroxyd wird herbeigeführt bei einer Konzentration von **0·04**% im Blute, durch Ammoniak von **0·4**% und durch Trimethylamin von **0·5**%. Ebenso von **0·002**% Salzsäure, **0·007**% Ameisensäure und **0·02**% Essigsäure. Bei der Hämolyse durch Säuren, z. T. auch durch Alkalien, findet Braunfärbung des gelösten Blutes statt, infolge von Hämatinbildung.

Eine große Gruppe hämolytischer Agenzien bilden die Lipoide (Cholesterin, Lecithin) lösenden Substanzen. Diese Gruppe fällt größtenteils mit der pharmakologischen Gruppe der indifferenten Narcotica zusammen. Hierher gehören Chloroform, Chloralhydrat, Äther, Alkohole, Urethane, Ester. Um eine Vorstellung von der Wirkungsstärke dieser Substanzen zu geben, sei erwähnt, daß (nach *Fühner* und *Neubauer*) die hämolytische Wirkung auftritt beim Äthylalkohol in Konzentration von **15**%, Äthylurethan **9**% und Äthylacetat (Essigester) **4**%. Chloralhydrat ist etwas wirksamer als Äthylacetat.

Die hier angegebenen Werte sind nur relative, unter sich vergleichbare, keine absoluten. Unter anderen Versuchsbedingungen (z. B. anderer Zeitdauer der Einwirkung, anderer Temperatur) erhält man andere Werte. In einem in Fig. 8 wiedergegebenen Versuche ist die hämolytische Grenze für den Äthylalkohol bei etwa **13**% gelegen. In diesem Versuche wurden zu je 5 cm^3 Alkohollösung 5 cm^3 5%iger Blutaufschwemmung gegeben. Die Alkoholkonzentration der 10 cm^3 Flüssigkeit betrug **11**—**16**%. Der Versuch wurde bei Zimmertemperatur ausgeführt. Eine Stunde nach dem Ansetzen des Versuches lag die hämolytische Grenze bei **16**%. Nach drei Stunden bei **15**%. Die photographische Aufnahme wurde erst 20 Stunden nach dem Ansetzen der Proben gemacht.

Die Hämolyse durch die bisher genannten Substanzen besitzt zum Nachweis von Giften keine nennenswerte praktische Bedeutung. Man könnte sie aber z. B. verwerten zur quantitativen Bestimmung von Fuselöl (Gärungsamylalkohol) im Äthylalkohol, da die höheren Alkohole hämolytisch wirksamer sind, als die niederen.[2] Praktisch wichtig ist die

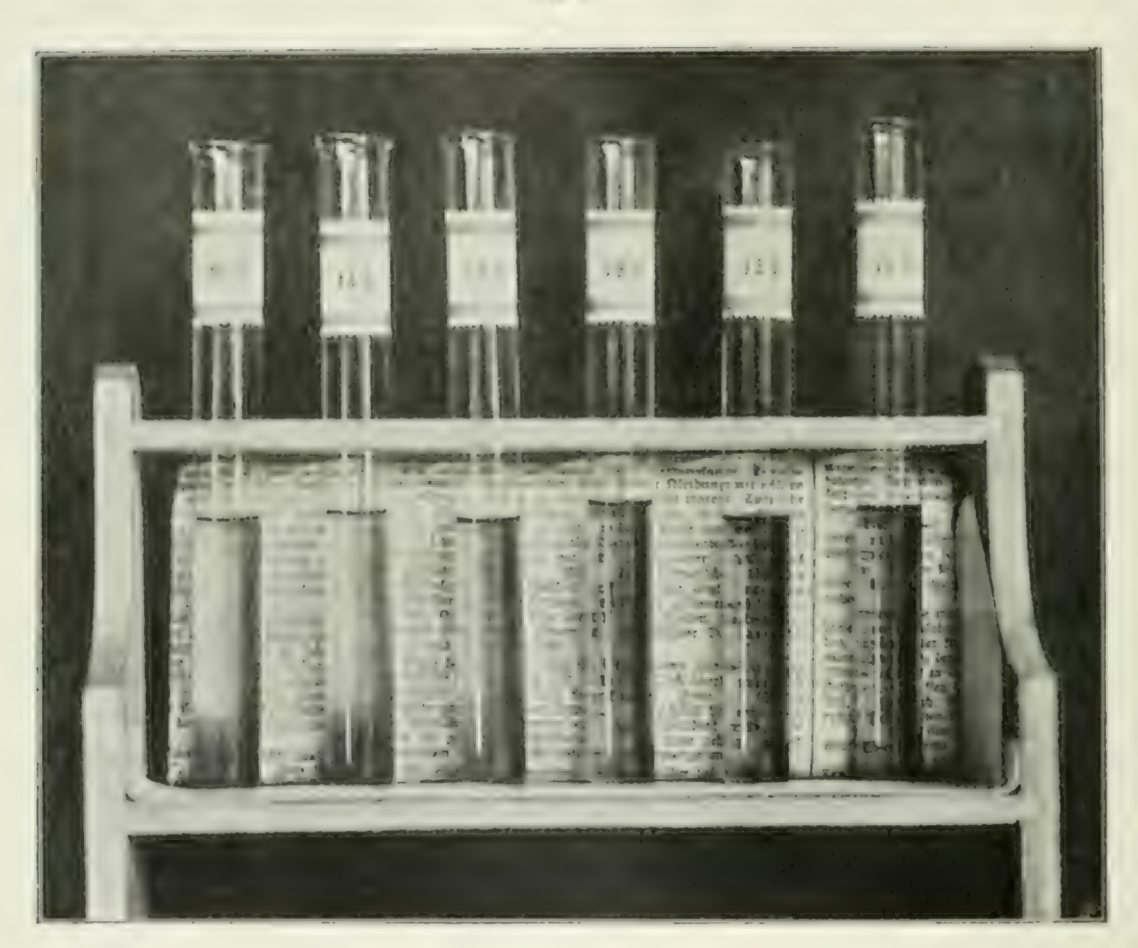
[1]) *H. Fühner* und *E. Neubauer*, Hämolyse durch Substanzen homologer Reihen. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 56. S. 344 (1907).

[2]) *A. J. J. Vandevelde*, Über die Anwendung biologischer Methoden zur Analyse von Nahrungsstoffen. Biochem. Zeitschr. Bd. **1**. S. 1 (1906) und *H. Fühner* und *E. Neubauer*, l. c.

Hämolyse aber hauptsächlich zum Nachweis der spezifischen Blutgifte, welche sich vor den bisher genannten Substanzen durch eine hämolytisch außerordentlich viel größere Wirksamkeit auszeichnen.

Zu den spezifischen Blutgiften gehören in erster Linie artfremde Sera. Normales Blutserum einer Tierart kann die Blutkörperchen einer anderen auflösen. Starke Hämolysine finden sich dann in giftigen tierischen Sekreten, wie dem Gifte von Schlangen, Kröten, Spinnen, Bienen. Ferner gehören, als toxikologisch wichtig, namentlich zahlreiche Pflanzenprodukte hierher. Schon manche Bakterien produzieren hämolytisch wirk-





Hämolyse durch Äthylalkohol

same Stoffe; auch finden sich solche in höheren Pilzen, nach *Kobert* z. B. in dem sehr giftigen Knollenblätterschwamm, Amanita phalloides und nach *Boehm* in der Lorchel, Helvella esculenta. Vor allem aber gehört hierher die Gruppe der Saponine und ihnen nahestehender Pflanzengifte, welche in zahlreichen Pflanzen vorkommen.

Aus einer größeren Tabelle von *R. Kobert*[1]) sei hier die Wirkungsstärke der wichtigsten Saponine wiedergegeben, verglichen mit Chloralhydrat und Solanin.

[1]) *R. Kobert*, Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904. S. 18. — Vgl. ferner *J. Gadamer*, Lehrbuch der chemischen Toxikologie. Göttingen 1909. S. 444.

Substanz	Völlige Hämolyse erfolgt noch bei	Autor
Chloralhydrat	1:20	*Kruskal*
Solanin	1:8300	*Kobert*
Guajaksaponin	löst kaum	*Frieboes*
Quillajasapotoxin	1:10000	*Kobert*
Quillajasäure (als Na-Salz)	1:10000	*Hoffmann*
Saponin. puriss. Merck	1:10000	*Pachorukow*
Roßkastaniensaponin	1:12000	*Weil. Kobert*
Senegin	1:12000	*Atlas*
Agrostemmasapotoxin	1:15000	*Kruskal*
Agrostemmasaponin	1:50000	*Brandl*
Levant. Seifenwurzelsapotoxin	1:20000	*Kruskal*
Melanthin des Schwarzkümmels	1:75000	*Kobert*
Digitonin des Fingerhuts	1:80000	*Kruskal*
Cyclamin des Alpenveilchens	1:100000	*Tufanow*
Sarasaponin der Sarsaparille	1:125000	*v. Schulz*
Dioscin der Dioscorea Tok. Mak.	1:400000	*Honda*

Die hier angegebenen Werte beziehen sich auf Bestimmungen, welche an 1%igen Rinderblutkochsalzaufschwemmungen ausgeführt wurden. Wichtig ist, daß die gewaschenen Blutkörperchen gegen Saponine viel empfindlicher sind als ungewaschene bei Gegenwart des Serums. So fand *Kruskal*[1]) als Wert für die hämolytische Wirkung am Agrostemmasapotoxin, wie in der Tabelle angegeben, am normalen 1%igen Blut den Wert **1 : 15.000**. An gewaschenen Blutkörperchen zu 1% in NaCl **1 : 38.000**. Dieser Unterschied dürfte auf den Lipoidgehalt des Serums zurückzuführen sein, denn, wie *Ransom*[2]) entdeckte, kann Saponin durch Cholesterin entgiftet werden.

Die hämolytische Methode eignet sich vor allem zum Nachweis dieser Pflanzengifte speziell der Saponine und ist von *K. Brunner*[3]) und *J. Rühle*[3]) zum Nachweis von Saponin in schäumenden Getränken (Limonaden) verwandt worden.

Ausführung der hämolytischen Versuche. Eine auf Saponin zu prüfende Substanz löst man in 0·9%iger Kochsalzlösung auf. Von defibrinierten und gewaschenen Rinderblutkörperchen stellt man eine 1%ige Aufschwemmung gleichfalls in physiologischer Kochsalzlösung her. Hat man nur sehr geringe Saponinmengen, so führt man die Untersuchung unter dem Mikroskop aus. Man gibt einen Tropfen der Blutaufschwemmung auf einen Objektträger, bedeckt ihn mit einem Deckglase und stellt etwa 300fache Vergrößerung des Mikroskopes ein. Läßt man dann seitlich einen Tropfen Saponinlösung zufließen, so kann man die allmähliche Auf-

[1]) *N. Kruskal*, Über Agrostemma Githago L. Dorpater pharmakol. Inst.-Arb. Bd. 6. S. 126 (1891).

[2]) *F. Ransom*, Saponin und sein Gegengift. Deutsche med. Wochenschr. 1901, S. 194. — Vgl. auch *A. Windaus*, Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Ber. d. D. chem. Ges. Bd. 42. S. 238 (1909).

[3]) *K. Brunner* und *J. Rühle*, zitiert nach *J. Gadamer*, Lehrbuch d. chem. Toxikologie. Göttingen 1909. S. 446.

hellung des Präparates durch dieselbe gut verfolgen. Die Blutkörperchen quellen erst und werden stark lichtbrechend, um darauf gewissermaßen zu verlöschen.[1])

Hat sich die Substanz als hämolytisch wirksam erwiesen, so ist zu ihrer weiteren Charakterisierung als Saponin noch ihre Entgiftung durch Cholesterin festzustellen. Das Cholesterin löst man zu 1% in Äther und gibt von dieser Lösung soviel zu der Lösung des Saponins in physiologischer Kochsalzlösung, daß auf 20 Teile Saponin 1 Teil Cholesterin kommt. Man schüttelt tüchtig durch und erwärmt im offenen Becherglase einige Stunden auf 40°. Diese Lösung wird dann, wenn sie ein typisches Saponin enthielt, nicht mehr hämolytisch wirken.

Bei genügenden Mengen Material untersucht man in kleinen oder größeren Reagenzgläsern. Immer sind Kontrollproben gleichzeitig anzusetzen und zu beobachten. Hat man eine Reihe Reagenzgläser mit verschiedenen Mengen hämolytischer Substanz angesetzt, so kann man die fortschreitende Aufhellung von der am stärksten wirksamen Konzentration bis zu der schwächsten gut verfolgen. In den Gläsern, in welchen sich die Blutkörperchen nicht lösen, setzen sie sich am Boden derselben ab. Man muß zu den Proben immer gut durchgemischte Blutkörperchenaufschwemmung verwenden. Auch verfährt man derart, daß man das Blut zur lösenden Flüssigkeit zusetzt und nicht umgekehrt. Nach dem Zusatz muß sofort gut umgeschüttelt werden, um Bindung der lösenden Substanz nur etwa an die unterste Schicht der Blutkörperchen zu vermeiden. Für die meisten toxikologischen Versuche am Blute wird, wie bei dem Saponinnachweis, die Ausführung bei Zimmertemperatur geschehen. Bei vergleichender Prüfung wird man nach 3—4 Stunden die hämolytische Grenze ablesen.

Über die Natur und Herkunft eines hämolytisch wirksamen Saponins kann man aus der Intensität der Wirkung bei Vergleichung mit der *Kobert*schen Tabelle einige Anhaltspunkte gewinnen.

2. Agglutination.

Die Tatsache, daß es Pflanzenstoffe gibt, welche an roten Blutkörperchen deren Zusammenkleben, Agglutination, neuerdings auch Konglutination genannt, herbeiführen können, wurde 1887 von *R. Kobert* und seinem Schüler *Stillmark*[2]) an dem wichtigsten hierhergehörigen Produkte, dem Ricin, entdeckt und ist seither häufig zu toxikologischer Charakterisierung dieser Substanzen gebraucht worden, für welche beweisende chemische Reaktionen nicht bekannt sind. Derartige giftige Pflanzenprodukte („Toxalbumine"), wie das Ricin der Ricinussamen, das Abrin der Paternostererbsen, das Crotin der Crotonsamen und das Robin der Rinde der falschen Akazie, besitzen die gemeinsame Eigenschaft, daß sie bisher

[1]) *J. Gadamer*, l. c. S. 447.

[2]) *H. Stillmark*, Über Ricin. Dorpater pharmakol. Inst.-Arb. Bd. 3. S. 59. Stuttgart 1889.

in einwandfreier Weise von ihrem Begleiteiweiß nicht befreit werden konnten und daß Versuchstiere gegen steigende Dosen derselben wie gegen Bakterientoxine immunisiert werden können *(Ehrlich)*.

Toxikologische Bedeutung besitzt in erster Linie das Ricin, das aus Preßrückständen der Ricinussamen gewonnen wird. Solche Ricinuspreßrückstände haben bei ihrem geringen Werte schon zur Verfälschung von Preßkuchen anderer ölhaltiger Samen, die als Futtermittel Verwendung finden, gedient, und Erkrankung der damit gefütterten Tiere herbeigeführt.

Ausführung der Agglutinationsprüfung. Handelt es sich darum, eine Substanz auf den Gehalt an Ricin zu untersuchen, so kann man nach *Kobert*[1]) in folgender Weise vorgehen: Man zerreibt den trockenen Rückstand innig mit mindestens der 10fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung und filtriert nach 24 Stunden. Das Filtrat hält das vorhandene Ricin in Lösung. Die Prüfung des Filtrates geschieht in der Weise, daß man einen Teil davon einem Kaninchen (s. d.) unter die Haut spritzt, einen anderen Teil mit etwa demselben Volumen oder mehr einer 2%igen Mischung von defibriniertem Rinderblut mit physiologischer Kochsalzlösung (2 cm^3 Blut + 98 cm^3 0·9%iger NaCl-Lösung) vermengt. Bei größerem Ricingehalt des Auszuges tritt rasch Agglutination ein. Bei geringem Gehalt kann die Blutprobe unsicher oder negativ ausfallen, während das injizierte Kaninchen nach mehreren Tagen doch noch erkrankt und stirbt.

Eine verdünnte wässerige Ricinlösung läßt sich nach *Cushny*[2]) dadurch anreichern, daß man in dieselbe gewaschene Fibrinflocken einträgt, auf welche sich das Gift niederschlägt. Die mit Wasser gewaschenen Flocken werden mit verdünnter Sodalösung behandelt, in welcher sich das Ricin löst. Die Sodalösung neutralisiert man mit Salzsäure und stellt nun mit dieser Lösung den Agglutinationsversuch an.

Die Agglutinationsprobe kann dadurch empfindlicher gestaltet werden, daß man mit Kochsalzlösung gewaschene Blutkörperchen verwendet, da das Serum nach *Kobert* die Ricinwirkung hemmend beeinflußt. Außerdem empfiehlt sich die Verwendung des empfindlicheren Meerschweinchenblutes an Stelle von Rinder- oder Kaninchenblut zu der Agglutinationsprobe.

Stillmark fand, daß bei 2%iger Blutkochsalzmischung Ricin in Konzentration **1 : 40.000** Kaninchenblut vollständig, bei einer Verdünnung **1 : 160.000** nur noch spurenweise agglutiniert, während Meerschweinchenblut in Konzentration **1 : 160.000** vollständig, in solcher von **1 : 600.000** immerhin noch schwach zusammengeballt wird.

Von der Vollständigkeit der Agglutination überzeugt man sich durch Filtration des agglutinierten Blutes durch Filtrierpapier, durch das die nichtagglutinierte Blutkörperchenaufschwemmung ungehindert hindurch-

[1]) *R. Kobert*, Einige Notizen über die Bedeutung und den biologischen Nachweis von vegetabilischen Agglutininen und Hämolysinen. Landwirtsch. Versuchsstationen. Bd. 71. S. 258. Berlin 1909.

[2]) *A. R. Cushny*, Über das Ricinusgift. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 41. S. 446 (1898).

geht. Ist das Filtrat nach der Agglutinationsprobe noch rot gefärbt, so ist die Agglutination unvollständig. Bei geringen Blutmengen stellt man die Probe statt im Reagenzglas in einem kleinen Uhrglase an und verfolgt die Erscheinung unter dem Mikroskop. Kontrollproben sind auch hier dringend nötig, da ebenso wie spontane Hämolyse auch spontane Agglutination der Blutkörperchenaufschwemmung vorkommen kann.

Vom Ricin unterscheidet sich das Abrin, der Giftstoff der Paternostererbsen (Jequiritisamen) in seiner Blutwirkung nur sehr wenig. Nach *Hellin*[1]) wirkt im Gegensatz zum Ricin das Abrin stärker auf Hunde- als auf Kaninchenblut ein.

Leichter als Abrin ist vom Ricin das Crotin, der Giftstoff der Crotonsamen zu unterscheiden. Nach *Elfstrand*[2]) agglutiniert dieses das defibrinierte Rinderblut, hingegen nicht das Blut von Meerschweinchen. Kaninchenblutkörperchen aber werden durch dasselbe hämolysiert. Hierbei erweist sich das Blut verschiedener Kaninchen als verschieden empfindlich.

Auf Grund verschieden starker Blutwirkung lassen sich vom Ricin noch andere hierhergehörige Substanzen unterscheiden, so nach *Kobert* und *Lau*[3]) das aus der Rinde der falschen Akazie gewonnene Robin.

Neuerdings wurde von *Wienhaus*[4]) und *Assmann*[5]) unter *Kobert* aus Schminkbohnen ein Phasin und aus Sojabohnen ein Sojaphasin genanntes eiweißhaltiges Produkt hergestellt, von denen namentlich das letztere eine der Ricinagglutination täuschend ähnliche Agglutination von Kaninchenblutkörperchen herbeiführt. Doch auch dieses Produkt läßt sich vom Ricin dadurch unterscheiden, daß es auf Blutarten, die vom Ricin agglutiniert werden, nicht einwirkt; besser aber lassen sich diese Phasine von dem giftigen Ricin durch ihre geringe Giftigkeit für Kaninchen (s. d.) unterscheiden.[6])

Der Frosch und seine isolierten Organe.

Im mittleren Europa sind hauptsächlich zwei Froscharten[7]) leicht und in größerer Menge zu erhalten[8]): Der Wasserfrosch, Rana escu-

[1]) *H. Hellin*, Der giftige Eiweißkörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut. Dissert. Rostock 1901.

[2]) *M. Elfstrand*, Über blutkörperchenagglutinierende Eiweiße. Görbersdorfer Veröffentlichungen, herausgeg. v. *R. Kobert*. Bd. 1. S. 11. Stuttgart 1898.

[3]) *Lau*, Über vegetabilische Blutagglutinine. Dissert. Rostock 1901.

[4]) *O. Wienhaus*, Zur Biochemie des Phasins. Biochem. Zeitschr. Bd. **18**. S. 228 (1909).

[5]) *F. Assmann*, Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Agglutinine. *Pflügers* Arch. Bd. **137**. S. 489 (1911).

[6]) Über den Nachweis von Ricin vgl. auch *Miessner*, Über die Giftigkeit der Ricinussamen. Mitteil. d. Kaiser Wilhelms-Instituts für Landwirtschaft in Bromberg. Bd. **1**. S. 217. Berlin 1909.

[7]) Zur Biologie des Frosches vgl. *Fr. K. Knauer*, Das Leben unserer heimischen Lurche und Kriechtiere. Dresden 1905. — *Fr. Hempelmann*, Der Frosch. Leipzig 1908. — Die Anatomie des Frosches ist ausführlich dargestellt in *E. Gaupp*, *A. Eckers* und *R. Wiedersheims* Anatomie des Frosches. 3. Aufl. 3. Bände. Braunschweig 1896—1904.

[8]) Wasserfrösche liefert Fischer *Fritz Novak*, Köpenik bei Berlin. Die Varietät Ridibunda in Größen von 40—150 *g* *A. v. Kovács*, Zoolog. Handlung, N.-Becskerek (Un-

lenta mit seiner für biologische Versuche gleichwertigen Varietät, dem Seefrosche, R. esc. Var. ridibunda und der Gras- oder Taufrosch, Rana fusca (temporaria). Beide Arten sind zum biologischen Giftnachweis erforderlich, denn sie reagieren manchen Giften gegenüber verschieden.

Da die Frösche sich im Winter verkriechen, so ist deren Beschaffung in den kalten Wintermonaten oft schwierig. Man versieht sich für den Winter am besten im Herbst mit einer genügenden Anzahl derselben und bewahrt sie in kühlem Raume in Behältern mit langsam fließendem oder öfters erneuertem Wasser auf. Die Sterblichkeit namentlich größerer Wasserfrösche ist in der Gefangenschaft häufig eine recht beträchtliche. Die Tiere erliegen parasitären Infektionen. Als häufige Krankheitserscheinung beobachtet man das Auftreten von Hautdefekten, vorzugsweise an der Schnauze. Die Grasfrösche halten sich meist besser in der Gefangenschaft. Fütterung der Frösche ist unnötig. In den Frühjahrs- und Sommermonaten

Fig. 9.



Links: Rana fusca, 42 g. Rechts: Rana esculenta, 46 g. Beide männlich. Aufnahme vom 12. November 1909.

wird man zu den biologischen Prüfungen immer möglichst frisch gefangene Tiere verwenden.

Der Wasserfrosch ist auf dem Rücken meist grün, der Grasfrosch braun gefärbt. Doch ist die grüne Färbung des Wasserfrosches durchaus unbeständig. Abgesehen davon, daß die Eigenfarbe der Tiere zwischen hell und dunkel je nach der Belichtung etc. wechselt, findet man häufig braun gefärbte Wasserfrösche. Konstanter erscheint die Färbung der Bauchhaut, welche beim Wasserfrosch weiß, beim Grasfrosch gelb ist. Das sicherste Unterscheidungsmerkmal für beide Arten bietet die Kopfform und hier namentlich die verschiedene Länge der Schnauze, von den Augen an gerechnet. Die Schnauze ist, wie Fig. 9 zeigt, bei Rana fusca kurz und stumpf, bei Rana esculenta länger und mehr zugespitzt.

garn). Durch Vermittlung der Diener an physiologischen und pharmakologischen Universitätsinstituten können Wasserfrösche und auch Grasfrösche bezogen werden.

Auf der Photographie sind zwei fast gleichschwere männliche Tiere dargestellt. Die Aufnahme ist Anfang November gemacht. Zu dieser Zeit sind bei Rana fusca die Daumenschwielen beim männlichen Tiere schon deutlich hervortretend, bei Rana esculenta noch wenig. Die stark ausgeprägten Daumenballen mit den vor der Brunstzeit auftretenden schwieligen Verdickungen sind neben den Schallblasen (diese nur bei R. esculenta!) die besten äußeren Kennzeichen für männliche Frösche. Erwähnt sei noch, daß die männlichen Tiere meist kleiner als die weiblichen sind. Bei Rana esculenta schwellen die Daumenballen erst später an, damit zusammenhängend, daß die Paarungszeit der Wasserfrösche später als die der Grasfrösche eintritt. Die Paarungszeit der Grasfrösche fällt in das erste Frühjahr, die der Wasserfrösche erst in die Monate Mai und Juni. Froschlaich und Kaulquappen, welche man im Frühjahr findet, stammen darum meist von Grasfröschen, im Sommer von Wasserfröschen. Dieser Hinweis mag genügen zur Identifizierung der zu toxikologischen Versuchen dienenden Kaulquappen.[1] Kaulquappen haben häufig Verwendung gefunden zu vergleichenden Bestimmungen des Wirkungsgrades von Giften. Von solchen seien hier lediglich *Overtons*[2]) bekannte Untersuchungen über die Wirkungsstärke der Narcotica genannt.

A. Beschreibung der Instrumente und Apparate.[3])

Zur Herstellung der bei der Prüfung von Giften nötigen physiologischen Präparate, wie isolierte Skelettmuskeln, Herz, Auge, bedient man sich ausschließlich anatomischer Scheren und Pinzetten. Messer sind nicht nötig. Von Pinzetten braucht man eine sogenannte Hakenpinzette, geeignet zum Erfassen der glatten Haut des Frosches, außerdem zwei

[1]) Über genauere anatomische Unterscheidungsmerkmale der verschiedenen Kaulquappenarten vgl. *F. Werner*, Die Reptilien und Amphibien Österreich-Ungarns und der Okkupationsländer. Wien 1897. S. 113.

[2]) *E. Overton*, Studien über die Narkose. Jena 1901. — Vgl. auch *I. Bang* und *E. Overton*, Studien über die Wirkung des Kobragiftes. Biochem. Zeitschr. Bd. 31. S. 243 (1911).

[3]) Die im Texte beschriebenen Apparate etc sind die im Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br. gebräuchlichen. Sie können, sofern keine andere Bezugsquelle angegeben ist, durch den Mechaniker des genannten Institutes, Herrn *Lantzsch*, zu nachstehenden Preisen bezogen werden: Froschbrett mit beweglichem Stab und Klammern (Fig. 11) 5 M. — Kymographion (Registrierapparat) von *E. Zimmermann*, Berlin N. 4, Chausseestraße 6 (Fig. 12, 13) 140 M. — Stativ mit drei Muffen und Aluminiumschreibhebel (Fig. 15) 35 M. — Stativ mit Zahnstange und Trieb, dazu ein Stab, 2 Muffen, 2 offene Muffen, 1 Stab mit Brettchen (Fig. 15) 45 M. — Zeitmarkieruhr (Fig. 18) 90 M. — Markierhebel (Fig. 19) 8 M. — *Jaquet*sche Zeitmarkieruhr von *E. Zimmermann*, Berlin N. 4, Chausseestraße 6 (Fig. 52) 125 M. — Akkumulatoren (*Gülcher*) (Fig. 20) pro Zelle 16 M. — Induktorium (Fig. 20) 30 M. — Reizelektrode (Fig. 20) 10 M. — Quecksilberschlüssel (Fig. 20) 10 M. — Abblender nach *O. Frank* von Mechaniker *W. Schmidt*, Inhaber *C. Schunk*, Gießen (Fig. 21) 40 M. — Wippe (Fig. 22) 7 M. — Feuchte Kammer (Fig. 39) 22 M. — Herzkammer mit 4 Kanülen und 3 Herzklammern (Fig. 52) 5·50 M. — Muskelklemme (Fig. 56 und 57 *K*) 12 M. — Mausbrett (Fig. 61) —·80 M. — Kaninchentrichter (Fig. 64) 17 M.

größere und zwei feine Pinzetten. Von Scheren genügt eine größere mit spitzem und stumpfem Blatt und eine ebensolche feine. Die Scheren sind der Reinigung wegen auseinandernehmbar.

Als Unterlage zum Herstellen der Froschpräparate dienen flache Eßteller neben dicken einseitig matten Glasplatten in der Größe 24 : 24 *cm*.

Zur Freilegung des Herzens am nichtnarkotisierten Frosche muß das Tier gefesselt werden. Dies geschieht vermittelst starker Baumwollfäden, welche in Form von Schlingen (Fig. 10) dem Frosche um die Beine gelegt werden, worauf man das Tier auf einem Brettchen der Größe 20 : 10 *cm* (*Focke* verwendet für die Digitalisprüfung [s. d.] längere Froschbretter) dadurch befestigt, daß die Fäden durch in das Brettchen eingesägte Spalte gezogen werden (vgl. Fig. 34). Die Spalte können in schräger Richtung in das Brettchen gesägt werden, damit Zurückgleiten der durchgezogenen Fäden bei Bewegungen des Tieres weniger leicht möglich ist. Für viele Versuche verwendbar ist ein gestieltes Froschbrett (Fig. 11), auf

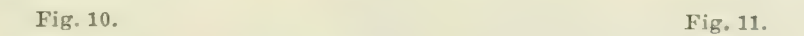
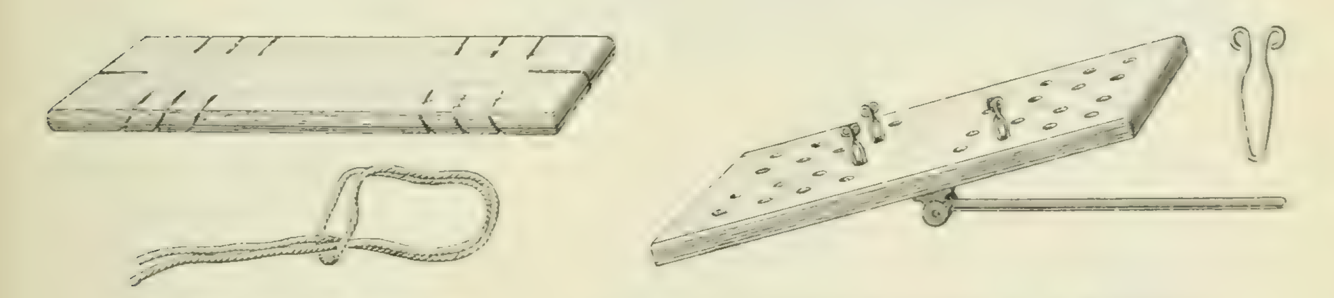


Fig. 10. Fig. 11.



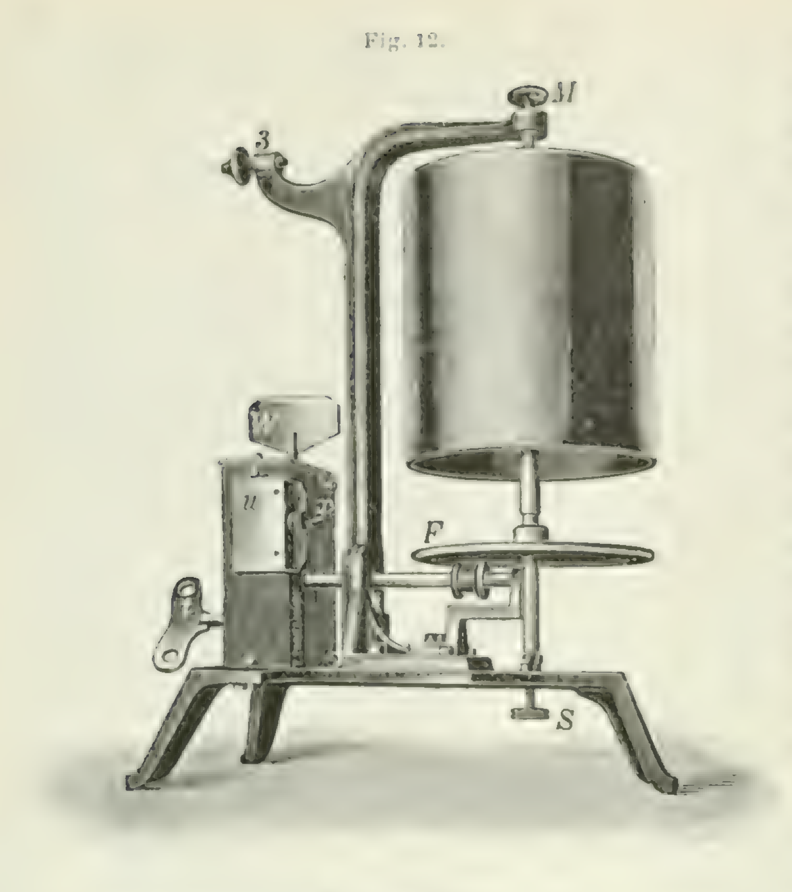
Froschbrett mit Fußschlinge. Gestieltes Froschbrett mit Fußklammern.

welchem der Frosch mit vier Drahtklammern in vorhandenen Öffnungen befestigt wird und das den Vorteil besitzt, mit einem daran beweglich angebrachten eisernen Stabe in den Muffen der Stative befestigt werden zu können. Will man den auf dem Froschbrette befestigten Frosch elektrisch reizen, etwa zum Nachweis von Veratrin, und die Muskelzuckungen graphisch registrieren, so kann dies, wie aus Fig. 26 ersichtlich ist, auf dem vorliegenden Froschbrett geschehen. Ein besonders zu diesem Zweck gebautes Froschbrett ist vor kurzem von *Boehm* [1]) beschrieben worden.

Zur graphischen Aufzeichnung der Muskelzuckungen, der Herzbewegung etc. ist ein Registrierapparat, ein sogenanntes Kymographion erforderlich. Zur Aufnahme der im Texte wiedergegebenen Kurven diente ein Instrument von *E. Zimmermann*, Berlin, welches bei billigem Preise den Vorzug besitzt, für raschen und sehr langsamen Gang verwendbar zu sein. Der in Fig. 12 und 13 abgebildete Apparat kann sowohl mit vertikal-, als auch horizontal rotierender Trommel benutzt werden. Zur Aus-

[1]) *R. Boehm*, Zwei kleine Apparate für Froschversuche. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 63. S. 159 (1910).

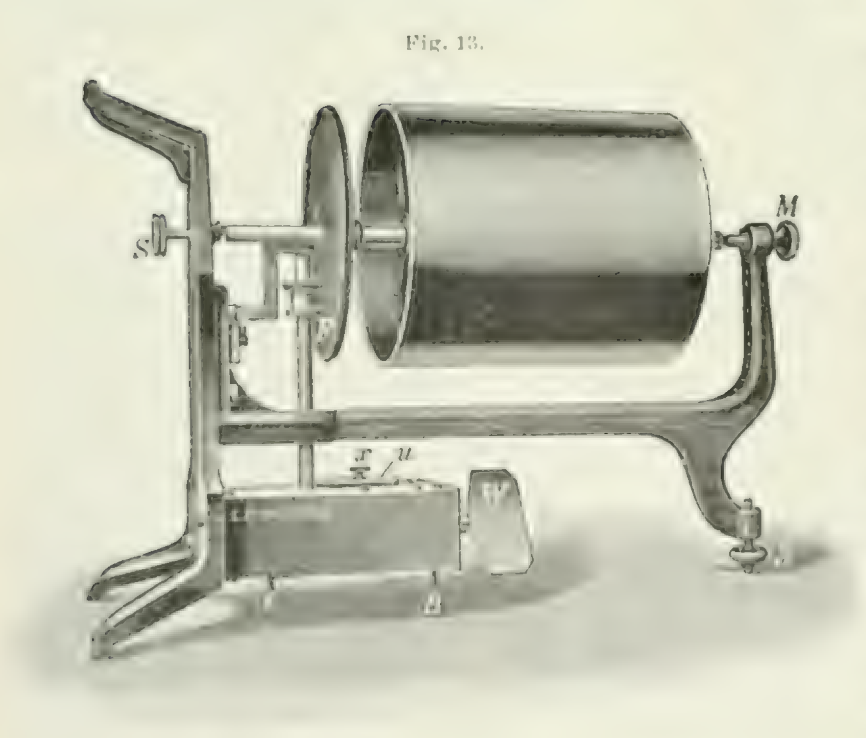
Fig. 12.



Kymographion

lotung der Höhenlage dient Schraube 3; zur Veränderung der Geschwindigkeit der Trommel, Friktionsscheibe und -rolle F, mittelst welcher die jeweilige Geschwindigkeit des Uhrwerkes im Verhältnis 1 : 6 verändert und der Trommel übermittelt werden kann. Die größte Geschwindigkeit erhält die Trommel bei Stellung der Rolle am Zentrum der Scheibe. Durch Verstellung der Rolle gegen die Peripherie wird die Umdrehungszeit bis auf etwa das 6fache verlangsamt. Um die Verschiebung bequem bewirken zu können, muß die Achse und die mit ihr verbundene Scheibe außer Kontakt mit der Rolle gebracht werden. Dies geschieht durch Hochdrehen der unter der Grundplatte befindlichen Schraube S. Das Uhrwerk wird mittelst Schlüssel t aufgezogen und durch den Hebel B arretiert bzw. in Gang gesetzt.

Fig. 13.



Kymographion.

Bei W lassen sich verschieden große Windflügel aufstecken und kann durch den größten derselben die Geschwindigkeit bis auf ca. 1 Stunde pro Umdrehung (= 500 *mm*) reduziert werden. Hierbei muß die Friktionsrolle an der Peripherie der Scheibe

stehen. Eine weitere Reduktion der Umdrehungsgeschwindigkeit wird erreicht durch Einschaltung des Ankerganges u und erhält hierbei die Trommel eine Umdrehungsgeschwindigkeit von etwa 4—24 Stunden pro Umdrehung. Das Einschalten des Ankerganges wird nach Lösen der Schraube x, durch ruckweises Hochdrücken des vorstehenden Kästchens u bewirkt. Es ist erforderlich, den Ankergang möglichst momentan aus- oder einzuschalten.

Die größte Umdrehungsgeschwindigkeit des Instrumentes beträgt (bei Verwendung ohne die Windflügel und Stellung der Friktionsrolle im Zentrum) 10—15 Sekunden pro Umdrehung. Doch kann das Instrument für besondere Zwecke von der Firma mit noch größerer Umdrehungsgeschwindigkeit geliefert werden.

Die Trommel des Kymographions wird mit Glanzpapier[1]) überzogen. Zu dem Zwecke wird das Instrument horizontal gestellt und die Trommel durch Hochdrehen der Schraube S leicht beweglich gemacht. Dann wird die rauhe Papierfläche mit einem Schwamme leicht angefeuchtet und die gummierten Ränder des Papieres übereinander geklebt. Das Papier darf keine Falten machen und muß überall gleich gut an der Trommelfläche anliegen. Nun wird das Papier unter schnellem Drehen der Trommel in horizontaler Lage berußt. Dies geschieht im Saume einer rußenden Gasflamme. Um die Gasflamme stark rußend zu machen, leitet man das Gas durch eine Flasche (Fig. 14), welche eine Mischung gleicher Teile Benzin und Benzol (Benzol allein rußt zu stark, Benzin zu schwach!) enthält. Das Gas entströmt einem rechtwinkelig gebogenen Glasrohr, dessen Spitze ausgezogen ist. Zum Berußen rückt man langsam bei möglichst rascher Trommelbewegung mit der Spitze der Gasflamme über der Papierfläche hin und her. Für feine Aufzeichnungen auf der Papierfläche darf die Berußung keine zu starke sein. Nach Fertigstellung einer Kurve wird die Trommel nach Hochschrauben des oberen Lagers M aus dem Kymographion genommen, das berußte Papier, unter Festhalten an seinem oberen Rande mit einem Finger, in der Nähe der zusammengeklebten Ränder durch einen Messerschnitt gespalten und die Kurve dann lackiert. Zum Lackieren verwendet man eine Lösung von gebleichtem Schellack in 96%igem Alkohol. Da der gebleichte Schellack unter Wasser aufbewahrt wird, so muß er erst gepulvert und das Pulver getrocknet werden, bevor man es im Weingeist auflöst. Das Verhältnis ist 1 : 10 (Vol.). Die Kurven werden an beiden Enden mit Pinzetten erfaßt und durch die in einer photographischen Schale befindliche Lacklösung gezogen, dann getrocknet

Fig. 14.



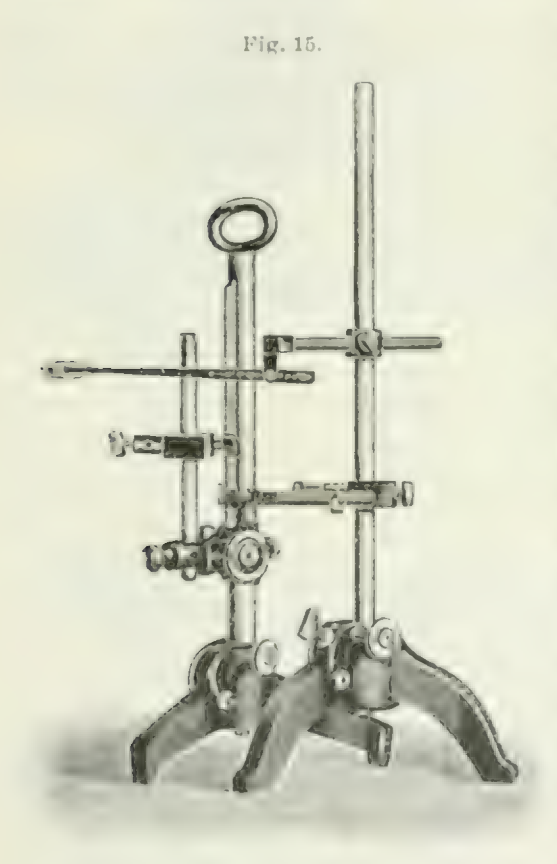
Berussungsflasche.

[1]) Durch die das Kymographion liefernde Firma zu beziehen.

Am besten werden die Kurven nach dem Trocknen noch ein zweites Mal lackiert, um sie besser vor Beschädigung zu schützen. Widerstandsfähiger wird die Lacklösung noch durch Zusatz von 1% venezianischem Terpentin.

Zur Ausführung der angegebenen Versuche sind mindestens drei Stative nötig, wie sie in Fig. 15 wiedergegeben sind. Davon zwei einfache, wie das in der Figur vorn befindliche, und eines mit Zahnstange und Trieb (in der Figur hinten), welche vertikale Verstellung der an der Stativstange befestigten Apparate ermöglichen. Zu den Stativen gehören „Muffen" und kleinere Stativteile, welche der Befestigung von Schreibhebeln, Herzkammer, Froschbrett etc. am Stativ dienen. Oberhalb des Fußes der Stative befindet sich eine endlose Schraube, deren Drehung die Drehung der Stativstange um die senkrechte Achse bewirkt, eine Vorrichtung, welche zum Anlegen des Schreibhebels an eine berußte Papierfläche nützlich ist.

Fig. 15.



Stative.

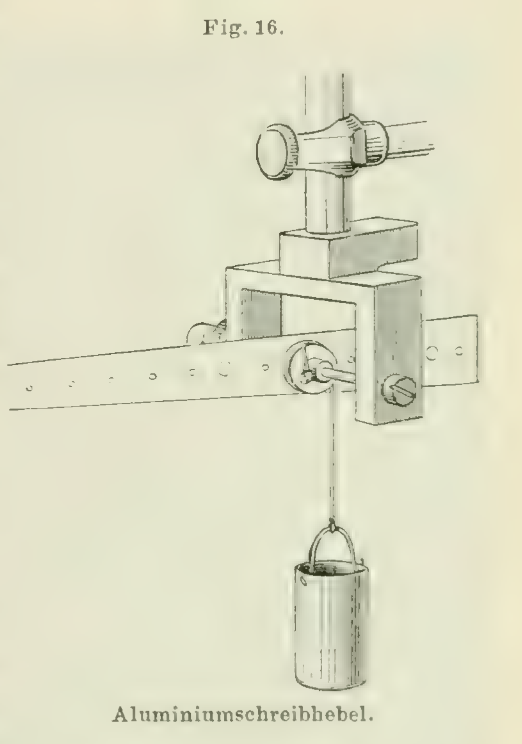
Zu den Stativen werden außerdem winkelförmige, mit Stab in den Muffen zu befestigende Stücke geliefert, welche eine dünne Achse tragen, an der ein Schreibhebel befestigt werden kann. Dieser findet zur Aufzeichnung von Herz- und Skelettmuskelbewegung auf der berußten Papierfläche des Kymographions Verwendung.

Das beste Material zur Herstellung von Schreibhebeln sind Strohhalme, in einer Qualität, wie sie in Kaffeehäusern gebraucht werden. Die Länge solcher Strohhalmschreibhebel beträgt durchschnittlich 20—25 *cm*. Zur Herstellung des Schreibhebels wird der Strohhalm in der Nähe des einen Endes in seiner Mitte ein Stück weit gespalten und durch den Spalt die aus ihren Lagern in dem Winkel genommene Schreibhebelachse eingeführt, nachdem die eine der beiden zum Festklemmen des Schreibhebels bestimmten kleinen Scheiben von ihr abgeschraubt ist. Diese wird dann wieder aufgesetzt und der Strohhalm festgeklemmt. Nahe der einen kleinen Scheibe, welche mit einer Rinne versehen ist, befindet sich eine kleine Schraube an der Achse, an der ein Faden angebracht und von hier aus über die Scheibe gelegt wird. Derselbe trägt an seinem freien Ende ein Gewicht oder einen kleinen mit Schroten zu füllenden Becher. Für die Aufzeichnung der Herzbewegung wird der längere Arm des Schreibhebels an der Achse entlastet (Fig. 16). Zur Aufnahme von Skelettmuskel-

zuckungen wird er hingegen mit Gewicht von 50—100 *g* belastet (Fig. 17).

In den Strohhalmschreibhebel werden in der Weise, wie dies Fig. 17 zeigt, beiderseits von der Achse mit glühendem Draht eine Anzahl Löcher eingebohrt. Die Schreibfahne des Hebels kann aus Schreibpapier hergestellt werden. Der Strohhalm wird zur Befestigung der Papierfahne an seinem vorderen Ende gespalten und in den Spalt das Papier eingeklemmt. Zur Fixierung dient Radfahrkitt (Kautschuklösung). Die Papierfahne am Aluminiumschreibhebel kann mit Siegellack befestigt werden. Die Schreibfahne wird an ihrem Ende fein zugeschnitten und nach der Kymographionfläche hin gebogen.

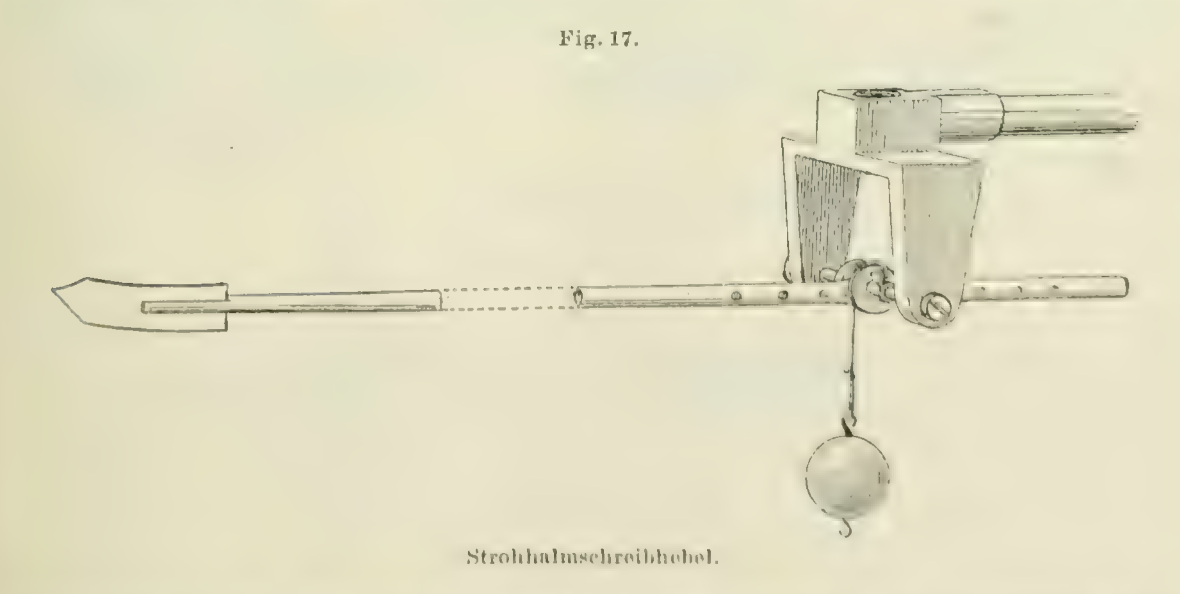
Fig. 16.



Aluminiumschreibhebel.

Auf der berußten Fläche der Kymographiontrommel wird unter die Herz- oder Skelettmuskelkurve die Zeit aufgezeichnet, je nach der Umdrehungsgeschwindigkeit des Instrumentes in Sekunden oder 10, 30, 60 Sekunden. Zur Zeitmarkierung verwendet man einen mit Schreibhebel versehenen Elektromagneten und eine Kontaktuhr nach *Bowditch*. Die gewöhnlich gebrauchte *Bowditch*sche Uhr hat den Nachteil, daß Elektromagnet und Uhr beständig unter Strom stehen, welcher nur im Moment der Zeitmarkierung unterbrochen wird. Dies bedingt eine starke

Fig. 17.

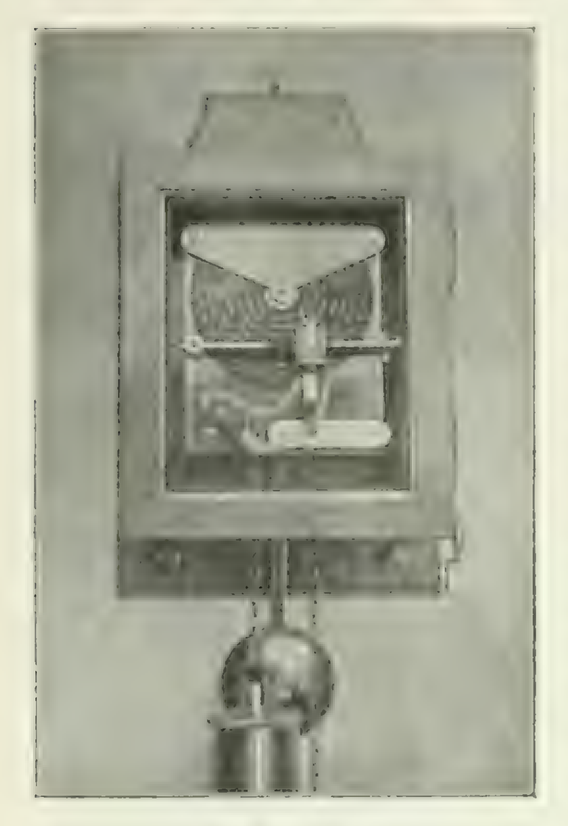


Strohhalmschreibhebel.

Inanspruchnahme der den Strom liefernden Elemente. Eine verbesserte derartige Zeitmarkieruhr wurde nach Angaben von Herrn Prof. *Straub*, vom Mechaniker des Pharmakologischen Institutes, Freiburg i. B., Herrn *Lautsch*, hergestellt. Diese besitzt statt der Metallscheibe des alten Modells eine

rotierende Hartgummischeibe[1]) (Fig. 18). Auf der Scheibe befinden sich acht an verschiedenen Stellen unterbrochene konzentrische Ringe, auf welchen ein auf jeden Kreis einstellbarer Hebel schleift. Beim Gang der Uhr fällt der Hebel in die Lücken der Kreise und schließt hierbei für kurze Zeit den elektrischen Strom. Dabei wird der mit Uhr und Element verbundene Markiermagnet (Fig. 19) gleichzeitig durchströmt und der Schreibhebel angezogen und wieder entfernt, was auf dem Kymographion verzeichnet wird. In den Stromkreis schaltet man zweckmäßig einen Quecksilberschlüssel ein, um völlige Unterbrechung des Stromes zu ermöglichen. Als Stromquelle verwendet man Akkumulatoren (2—4 Volt).

Fig. 18.

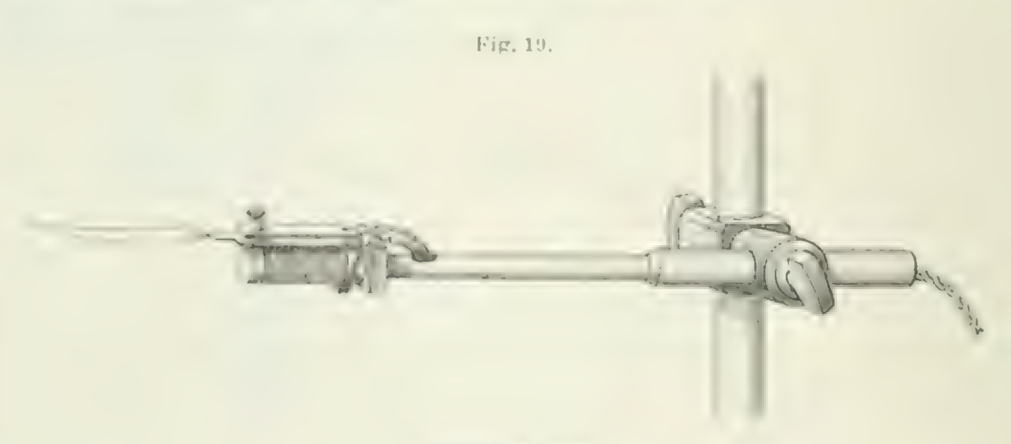


Zeitmarkieruhr.

Die Zeitmarkieruhr ist verwendbar zur Aufzeichnung von 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30 und 60 Sekunden. Zur Aufzeichnung von $^1/_5$ Sekunden und Sekunden existiert eine kleine von *Jaquet* konstruierte Uhr (vgl. Fig. 52), welche recht brauchbar, aber teuer ist.

Der Markierhebel kann am gleichen Stativ wie der die Muskelkurve aufzeichnende Schreibhebel angebracht werden, wie z. B. aus Fig. 36 ersichtlich. Besser ist derselbe an einem zweiten Stative unterzubringen, wobei man ihn am bequemsten entgegen der Trommelbewegung des Kymographions aufstellt.

Fig. 19.



Markiermagnet.

Ob ein Muskel oder Nerv eines Untersuchungstieres gelähmt oder tot ist, läßt sich dem Organ nicht ohneweiteres ansehen. Es läßt sich dies

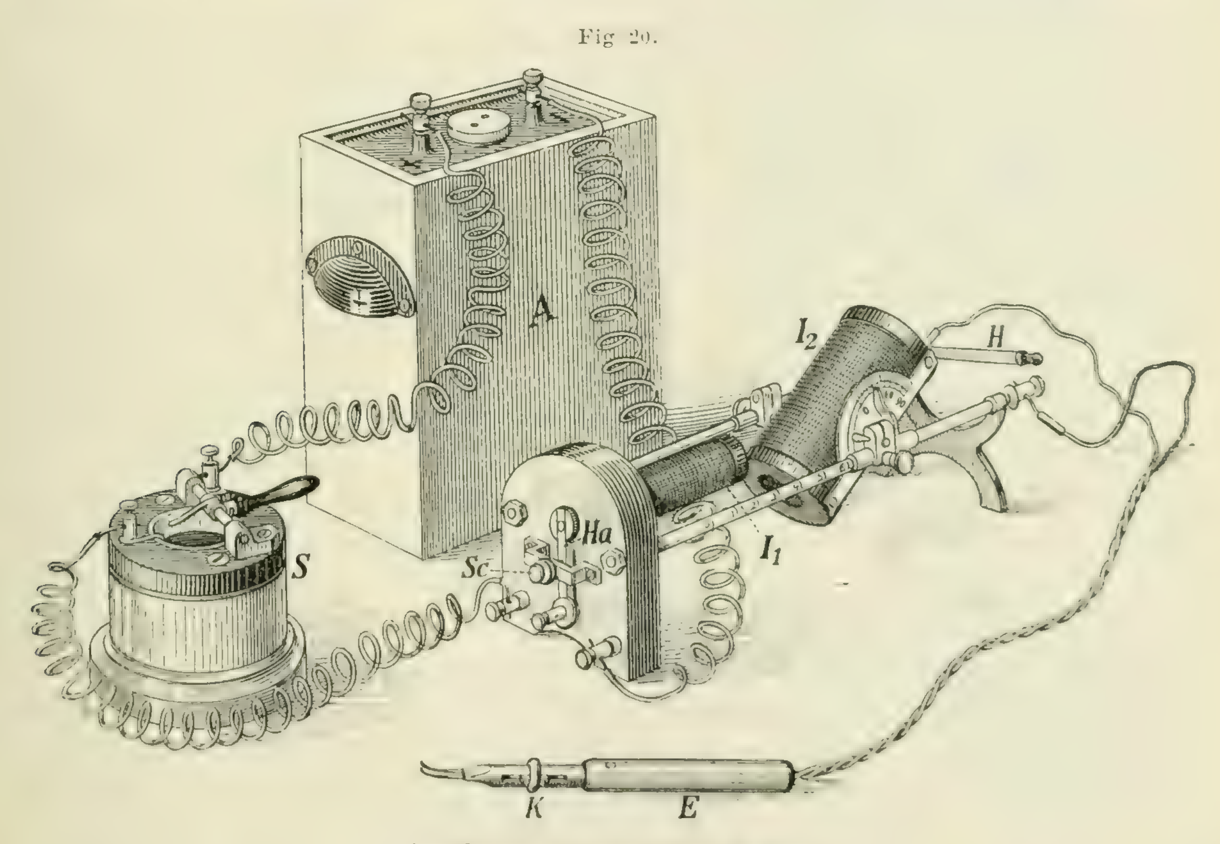
[1]) Diese ist dem Mechaniker des Pharmakologischen Institutes in Freiburg, Herrn *Lantzsch* geschützt.

aber feststellen durch Reizung des betreffenden Organes, und hierzu dient am besten diejenige durch den elektrischen Strom. Zur Ausführung derartiger Prüfung dient das folgende Instrumentarium:

Als Stromquelle ein Akkumulator. Bei Benutzung solcher muß man ein kleines (Taschen-)Voltmeter besitzen, um das Element von Zeit zu Zeit zu prüfen. Ein frisch geladener Akkumulator zeigt auf dem Voltmeter eine Spannung von 2·1—2·3 Volt an. Dieselbe geht beim Gebrauch allmählich zurück. Sobald sie sich 1·8 Volt nähert, muß das Element frisch aufgeladen werden. Die Art und Weise, wie dies geschieht, ist aus der dem Akkumulator beigegebenen Gebrauchsanweisung zu ersehen.

Zur elektrischen Reizung, welche für die Zwecke des biologischen Giftnachweises ausschließlich mit Induktionsströmen (faradischen Strömen)

Fig. 20.



Anordnung zur elektrischen Reizung.

geschieht, ist die in Fig. 20 wiedergegebene Versuchsanordnung empfehlenswert.

Sie besteht aus Akkumulator *(A)*, Quecksilberschlüssel *(S)*, Induktorium und Elektrode *(E)*, untereinander verbunden durch isolierte Kupferdrähte.

Der Quecksilberschlüssel *(S)* dient zur Öffnung und Schließung des Stromes. Ist das Quecksilber in dem Porzellannapfe nach längerem Gebrauche mit einer Oxydschicht bedeckt, so muß es erneuert werden. Die Oxydation wird verzögert, wenn man das Quecksilber beim Gebrauch des Schlüssels mit 30%igem Alkohol überschichtet.

Die Reizelektrode *(E)* endigt gabelförmig in zwei Drähten, die zur Berührung des Muskels oder zum Darüberlegen des Nerven dienen und

durch Verschiebung des Knopfes *(K)* in ihrer gegenseitigen Entfernung verstellt werden können.

Das kleine abgebildete **Induktorium** ist für vorliegende Zwecke ausreichend. Es besteht in der Hauptsache aus der primären Rolle *(I 1)*, der sekundären Rolle *(I 2)* und dem mit der Schraube *(Sc)* verstellbaren Hammer *(Ha)*. Die sekundäre Rolle des Apparates ist um eine horizontale Achse drehbar. Je mehr die sekundäre Rolle in ihrer Stellung zur primären dem rechten Winkel sich nähert, desto schwächer wird der induzierte Strom. Der Hebel *(H)* ermöglicht Kurzschluß, so daß kein Strom in die Elektrode gelangt. Man kann mit dem Apparat sowohl mit Einzelinduktionsschlägen wie tetanisierend reizen. Ist der Hammer *(Ha)* durch die Schraube *(Sc)* fest an den weichen Eisenkern der primären Rolle angedrückt, so erhält ein von der Elektrode berührter Muskel bei Schließung des Schlüssels *(S)* einen **Schließungs-**, beim Wiederöffnen einen **Öffnungsinduktionsschlag** und wird in beiden Fällen mit einer Einzelzuckung antworten, stärker hierbei bei der Öffnung als bei der Schließung des Stromes. Dreht man die Schraube *(Sc)* aber etwa 1 *mm* weit zurück, so daß der Hammer zwischen ihr und dem Eisenkern hin- und herschwingen kann, so bekommt man so lange andauernde Reizung des Muskels, als der Schlüssel geschlossen ist. Man nennt diese fortwährend durch die Hammerbewegung unterbrochene Reizung des Muskels eine **tetanisierende**, weil der Muskel durch sie in den Zustand einer Dauerkontraktion (Tetanus) versetzt wird.

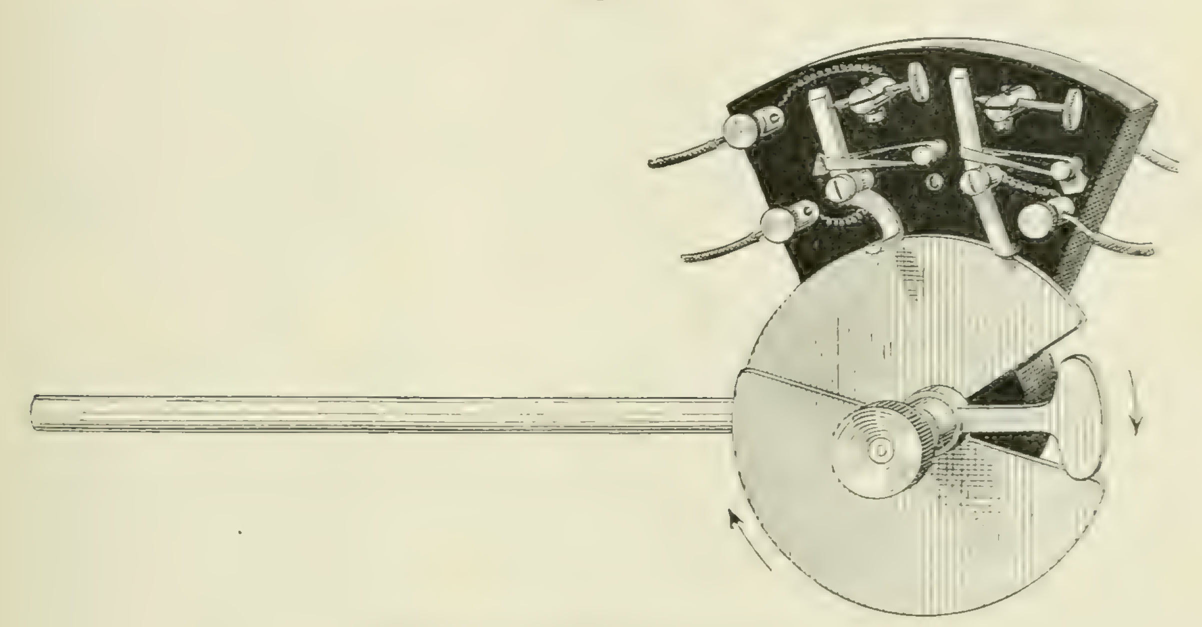
Wie erwähnt, zuckt der Muskel stärker bei der Reizung mit Öffnungs- als mit Schließungsinduktionsschlägen. Will man einen Muskel oder ein Nervmuskelpräparat wiederholt rhythmisch mit **gleichstarken** Schlägen reizen, so muß man entweder den Öffnungs- oder den Schließungsinduktionsschlag unwirksam machen, ihn „**abblenden**". Dies kann geschehen durch Anwendung des Kurzschlußhebels *(H)* oder bequemer durch Verwendung von zwei Quecksilberschlüsseln, wie dies beim Nachweis von Veratrin (vgl. Fig. 27) angegeben ist. Für länger fortzusetzende rhythmische Reizung ist die manuelle Abblendung besser durch mechanische zu ersetzen. Ein einfacher gut funktionierender rotierender „Abblender" ist von *O. Frank*[1]) angegeben worden. Derselbe findet hier zum Nachweis von Curarin am Nervmuskelpräparat Verwendung und besteht aus folgenden Teilen (Fig. 21):

Auf einem Hartgummistück, dessen Form aus Fig. 21 zu ersehen ist, sind, um eine Walze drehbar, drei in ihrer Lage zueinander verstellbare Messingstücke (Kreissektoren, Flügel) befestigt. Die Unterbrechung geschieht durch zwei Hebel, Messingbügel, die mit zwei Quecksilberschlüsseln (vgl. Fig. 27) vergleichbar sind. Der eine Schlüssel ist in den primären, der andere, der Kurzschlußschlüssel, in den sekundären Leitungskreis eingeschaltet. Jeder Hebel wird durch ein Gummiband an die Platinspitze einer mit den Polschrauben leitend verbundenen Schraube angedrückt und

[1]) Beschrieben in der Dissertation von *K. Seitz:* Der periodische Wechsel der Erregbarkeit des Herzmuskels. Gießen 1906. S. 17.

ist an der Berührungsseite mit einem Platinstreifen versehen. Der kleine Flügel hebt bei seiner Drehung den in der Zeichnung links befindlichen Bügel, die beiden großen Flügel den rechts befindlichen von ihrem Anschlag ab und öffnen so den Stromkreis. Die Drehung der Flügel erfolgt im Sinne eines Uhrzeigers. Wenn wie in Fig. 43 die beiden Pole des Abblenders rechts (wovon einer auf der Rückseite der Hartgummiplatte) in

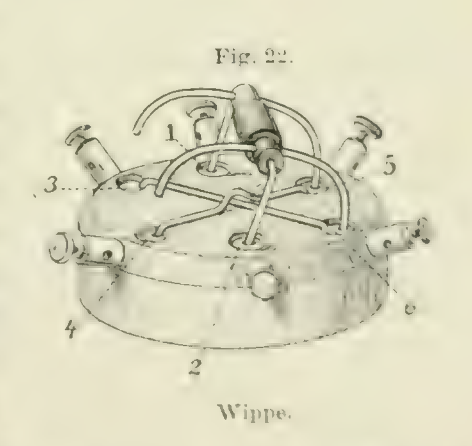
Fig. 21.



Rotierender Abblender nach *O. Frank.*

den primären, die beiden links in den sekundären Stromkreis eingeschaltet sind, in welch letzterem auch das Nervmuskelpräparat in Nebenschließung sich befindet, so erhält man bei der gezeichneten Stellung der Flügel (Fig. 21) rhythmische Schließungszuckung. Wird bei geschlossenem Kurzschlußschlüssel des sekundären Stromkreises der primäre Stromkreis geöffnet (die in der Figur gezeichnete Stellung!), so bleibt dies ohne Einwirkung auf das Nervmuskelpräparat. Bei weiterer

Fig. 22.



Wippe.

Drehung der Flügel wird, solange der primäre Hebel noch geöffnet ist, der sekundäre, gleichfalls ohne Wirkung, geöffnet. Solange er aber offen, erfolgt Schließung des primären Kreises, die eine Muskelzuckung auslöst, während die darauf folgende Schließung des sekundären Kreises wieder wirkungslos bleibt. Wechselt man die Pole um, so erhält man Öffnungsschläge.

Der Apparat wird in die Muffe eines Stativs eingespannt und mit gewünschter Geschwindigkeit durch einen Elektromotor in Umdrehung versetzt.

Zum Nachweis von Curarin am Nervmuskelpräparat ist, wie aus Fig. 43 ersichtlich ist, noch ein Stromwender, eine sogenannte Wippe nötig (Fig. 22). Dieselbe besteht aus einem Holzblock mit 6 Quecksilber-

näpfen, die leitend mit 6 Klemmschrauben in Verbindung stehen. Zu dem Curarinversuch wird die kreuzförmige Drahtverbindung zwischen Napf 4, 5 und 3, 6 entfernt. Wird die Wippe so in die Stromkreise eingeschaltet, wie dies aus Fig. 43 hervorgeht, so kann durch Umlegen des Drahtgestells abwechslungsweise die Stromzuführung zum Muskel direkt oder zum Nerven erfolgen.

B. Nachweis und Bestimmung von Giften am ganzen Frosch.

Eine Anzahl forensisch wichtiger organischer Gifte läßt sich durch das Vergiftungsbild, welches sie nach subkutaner Injektion an Fröschen hervorrufen, gut charakterisieren. Die Beobachtungen am Frosch können dann im Verein mit chemischen Identitätsreaktionen häufig zur sicheren Diagnose solcher Gifte führen. Die wichtigsten, auf diese Weise am Frosch erkennbaren Gifte sind die folgenden:

Die zentral (Gehirn, Rückenmark) erregenden: Strychnin, Pikrotoxin, Cicutoxin, Nicotin. Das zentral lähmende Colchicin. Die peripher (Muskel, Nervenende) erregenden: Guanidin und Veratrin, die peripher lähmenden: Curarin und Coniin. Die Skelettmuskelgifte: Coffein und Theobromin und die Herzmuskelgifte: Digitalin, Digitoxin, Strophanthin, Helleborein, Aconitin und Muscarin. Mit der hier vorgenommenen Einteilung soll nur angezeigt werden, welches die hervorstechendsten und zum biologischen Nachweis dienenden Wirkungen der betreffenden Gifte sind. Auf andere Wirkungen derselben, z. B. zentrale Lähmung im Anschluß an die zentrale Erregung, wird bei der Beschreibung der Hauptwirkung hingewiesen werden.

Nur wenn der Verdacht auf das Vorhandensein eines der genannten oder ähnlich wirkender Gifte vorliegt, hat es Sinn, eine zu prüfende Lösung Fröschen zu injizieren, und auch hier ist bei den Substanzen Aconitin, Coffein, Guanidin, Muscarin, Theobromin, Veratrin, sobald nur geringe Giftmengen für die Untersuchung zur Verfügung stehen, nicht der ganze Frosch, sondern das für die Diagnose besonders in Betracht kommende isolierte Organ, wie Herz- oder Skelettmuskel, zu der Prüfung zu verwenden.

Handelt es sich darum, die Giftigkeit einer Substanz überhaupt darzutun, so injiziert man mit den zu prüfenden Lösungen nicht Frösche, sondern die dem Menschen näherstehenden Warmblüter. Bei kleinen Substanzmengen verwendet man weiße Mäuse, bei größeren Katzen oder Hunde.

Zur Injektion von Fröschen sowohl, wie von Warmblütern, wie zu allen andern biologischen Versuchen, dürfen nur neutrale Lösungen Verwendung finden. Zur Neutralisation von Alkalien verwendet man Salzsäure oder Weinsäure. Zur Neutralisation von Säuren Natronlauge oder Natriumkarbonat. Geringer Natriumkarbonatüberschuß schadet zur subkutanen Injektion nichts, während jeder Säureüberschuß reizt. Lösungen,

welche Tieren subkutan injiziert werden, müssen frei sein von anorganischen Salzen in nennenswerten Mengen, namentlich von Kalium- und Ammoniumsalzen.

Subkutane Injektion an Fröschen. Zur Prüfung auf Gifte dürfen nur gesunde Frösche gebraucht werden. Tiere, welche aufgestoßene Schnauzen oder sonstige, namentlich an der Bauchseite auftretende Hautdefekte (Decubitus) zeigen, sind hierzu ungeeignet. Die Dosierung der Gifte bei allen Tierversuchen erfolgt nach dem Körpergewicht der Tiere.[1] Kleinere Frösche von etwa 30 *g* sind größeren Tieren, wegen der geringeren zur Vergiftung nötigen Mengen, vorzuziehen.

Zur Vergiftung bestimmte Tiere werden in geeigneten Töpfen mit Drahtdeckel bei Zimmertemperatur gehalten und täglich mit frischem Wasser abgespült. Frösche, welche im Winter aus kaltem Raume entnommen werden, reagieren langsamer und zum Teil anders als Tiere, die bei Zimmertemperatur erst mehrere Tage gehalten wurden.

Man prüft den Frosch vor der Injektion einer zu untersuchenden Lösung erst, ob er sich normal rasch aus der Rückenlage umdreht und normal springt. Zu beobachten ist auch die meist unregelmäßig erfolgende Lungenatmung, erkennbar an der Bewegung der Flanken, und die regelmäßiger erfolgende Kehlbewegung. Ferner wird man eine Zählung der Herzschläge vor Beginn des Versuches anstellen. Man kann bei richtiger Haltung des Frosches gegen das Licht[2]) die Herzschläge meist deutlich an Hebungen und Senkungen der Brustwand auf beiden Seiten des Brustbeins erkennen. Unter dem Mikroskop ist endlich an einer ausgespannten Schwimmhaut[3]) die normale Blutzirkulation festzustellen.

Die Injektion von Giftlösungen an Fröschen wird meist subkutan vorgenommen.

Die Haut des Frosches läßt sich in großen Falten von der darunterliegenden Körpermuskulatur, an welcher sie nur an einzelnen Stellen festgeheftet ist, abheben. In die Zwischenräume zwischen Haut und Muskulatur, in die sogenannten Lymphsäcke, injiziert man die zu prüfenden Gifte. Man kann, je nach dem Zwecke, welchen man mit der Injektion verfolgt.

---

[1]) Zu genaueren Dosierungen sind nur männliche Frösche brauchbar, da das Gewicht der weiblichen Tiere durch das wechselnde Gewicht der Eierstöcke großen Schwankungen unterworfen ist.

[2]) Man erfaßt hierzu den Frosch fest mit einer Hand, wie zur subkutanen Injektion (s. d.) und hält mit dem Daumen der anderen Hand den Kopf des Frosches durch Druck auf die Kehle nach hinten. Hierdurch wird die Haut glatt gespannt und werden die störenden Atembewegungen während der Herzbeobachtung unterdrückt.

[3]) Man hält den Frosch mit der Hohlhand, streckt ein Bein aus und legt dessen Fuß auf einer Glasplatte (9 : 12) auf, welche auf dem Objekttische des Mikroskopes liegt. Mit 2 Fingern derselben Hand hält man zwei Zehen auseinander und entfaltet so die Schwimmhaut, auf deren äußeren Rand das Mikroskop eingestellt wird. Es darf auf den Fuß kein starker Druck ausgeübt werden, sonst unterdrückt man die Zirkulation in den Gefäßen. Auch darf der Druck kein wechselnder sein: Bei stillstehender Zirkulation kann durch solchen aktive Bewegung der Blutsäule vorgetäuscht werden.

in den Rückenlymphsack (unter die Rückenhaut) oder in den Oberschenkellymphsack oder in den Brust- und Bauchlymphsack injizieren. Am meisten ist für den Giftnachweis die Injektion in den Brustlymphsack zu empfehlen, da bei dieser die injizierte Flüssigkeit nicht wieder ausfließen kann, was bei Injektion in Schenkel- und Rückenlymphsack selten ganz vermieden wird. Zur Injektion in den Brustlymphsack erfaßt man den mit einem Handtuch eventuell erst abgetrockneten Frosch mit der Hohlhand über seinem Rücken, hält mit 4. und 5. Finger den Leib und die ausgestreckten Hinterbeine und zwischen 2. und 3. Finger das eine Vorderbein, während das andere durch Zurückdrücken mit dem Daumen fixiert wird. Mit der anderen Hand führt man die Nadel der gefüllten Injektionsspritze seitlich in die Mundhöhle ein und schiebt dann, die unter der Haut liegende Nadelspitze mit dem Auge verfolgend, diese seitlich vom Brustbein vorsichtig vor, bis etwa in die Herzgegend. Hier angekommen, entleert man den Inhalt und zieht die Nadel zurück. Die Nadel muß dicht unter der Haut vorgeschoben werden, was leicht ohne Durchstechen derselben nach außen hin gelingt, wenn der Frosch gut festgehalten wird. Macht die Brusthaut hierbei Falten, so durchsticht man namentlich die dünne Haut des Grasfrosches leicht.

Als Injektionsspritze für Frösche ist eine Rekordspritze (vgl. S. 23) von 2 *cm*³ mit genügend langer Nadel empfehlenswert. Die Mengen, welche man Fröschen auf einmal injiziert, bewegen sich in den Grenzen von 1/2—3 *cm*³.

Nach der Injektion setzt man das Versuchstier auf einen Teller unter eine Glasglocke, notiert das vorher festgestellte Gewicht des Tieres, die Zeit der Injektion und die Menge der injizierten Flüssigkeit. Zweckmäßig wird man, um den Frosch dauernd feucht zu erhalten, einige Kubikzentimeter Wasser auf den Teller gießen. Vom Zeitpunkt der Injektion an ist das Tier genau zu beobachten und vom Normalen abweichendes Verhalten zu notieren. Hat man eine alkoholische oder saure Flüssigkeit, die reizend wirken, injiziert, so springt das Tier gleich nach der Injektion lebhaft unter der Glasglocke. Allmählich tritt Beruhigung ein und erst jetzt kann man etwa vorhandene Wirkungen der genannten Gifte beobachten.

1. Der Nachweis von Strychnin.

Die durch Strychnin am Frosch hervorgerufenen Krämpfe sind im Gegensatz zu den durch Pikrotoxin bedingten charakterisiert durch vorwiegende Streckstellung der Hinterbeine, so daß das in Fig. 23 wiedergegebene Vergiftungsbild zustande kommt.

Diese Streckkrämpfe, der sogenannte Tetanus, treten an Wasserfröschen und Grasfröschen nach kleinen Strychnindosen in gleicher Weise auf. Der Wasserfrosch ist gegen Strychnin etwas empfindlicher als der Grasfrosch.

Bei kleinen Fröschen von 25—30 *g* Gewicht, welche in Zimmertemperatur gehalten wurden, beginnen die ersten Zeichen einer Strychninwirkung

bei Dosen von **5/1000** ***mg*** des Nitrats. Dieselben bestehen in einer leichten „Steigerung der Reflexe" beim Wasserfrosch, dadurch nachzuweisen, daß man den Frosch leise auf dem Rücken berührt, wobei er, oft blitzschnell, manchmal unter schwachem Quaken, zusammenzuckt. Bei dieser Dose ist beim Grasfrosch meist noch keine Wirkung zu sehen.

Bei Dosen von **1/100** ***mg*** des Nitrats wird bei beiden Froscharten die Reflexsteigerung deutlich und hält, namentlich beim Wasserfrosch, mehrere Stunden an.

Zwischen **2/100** und **5/100** ***mg*** des Nitrats liegen für mittelgroße Frösche die niedersten Tetanus hervorrufenden Dosen. Bei **5/100** ***mg*** zeigen die Tiere nach etwa 10 Minuten Reflexsteigerung, nach 20—30 Minuten erfolgen auf äußeren Reiz, z. B. beim Beklopfen des Tellers, die ersten tetanischen Anfälle. Anfangs sind dieselben noch von kurzer Dauer, und die Tiere ziehen nach dem Streckkrampf die Hinterbeine wieder an. Später werden diese dauernd gestreckt gehalten und die Krämpfe erfolgen scheinbar ohne äußeren Anstoß. Die Vorderbeine werden während der Krämpfe übereinander gekreuzt. Zur Anfertigung der Zeichnung wurde ein Grasfrosch gewählt, da bei diesen die Starrheit der Beine, verbunden mit Dehnung der Schwimmhäute, besser ausgeprägt ist als bei Wasserfröschen.

Fig. 23.

Rana fusca. Strychnintetanus.

Bei Dosen von etwa **1** ***mg*** Strychninnitrat beginnt neben der Erregung schon eine darauffolgende Lähmung [1]) sich geltend zu machen. Die Lähmung tritt in auffälliger Weise nur an Wasserfröschen zutage und betrifft bei diesen sowohl das Zentralnervensystem, wie die motorischen Nervenenden im Muskel (Curarinwirkung). Sie tritt leichter bei Warmfröschen (im Sommer) als bei Kaltfröschen auf.

Dosen von mehreren Milligrammen bewirken beim Wasserfrosch fast keinen Tetanus mehr, sondern nur Lähmung. Solange die Herztätigkeit der Frösche nach den Strychningaben eine ausreichende ist, erholen sich dieselben selbst nach großen Dosen wieder, wenn man sie in öfter gewechseltem Wasser liegen läßt. In dieses wird, oft erst nach Verlauf mehrerer Tage, alles Strychnin wieder ausgeschieden.

[1]) Vgl. *E. Poulsson*, Über die lähmende Wirkung des Strychnins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 26. S. 22 (1890).

Kobert[1]) und nach ihm *Focke*[2]) empfehlen als empfindlicher zum Strychninnachweis sog. „Reflexfrösche", d. h. geköpfte Tiere oder solche, denen das Gehirn, wie beim Veratrinnachweis angegeben ist, zerstört wurde. Reflexfrösche sitzen noch normal, zeigen aber keine spontanen Bewegungen mehr.

Erwähnung verdient, daß von anderen toxikologisch wichtigen Alkaloiden noch das Brucin, Thebain, Morphin und Coffein Tetanus an Fröschen hervorrufen, aber erst in viel größeren Dosen als das Strychnin, von welchem diese Alkaloide außerdem leicht durch chemische Identitätsreaktionen unterschieden werden können.

Zum Nachweis von Strychninmengen, welche kleiner sind als etwa **2/100** ***mg***, sind Versuche an der weißen Maus (s. d.) anzustellen.

2. Der Nachweis von Pikrotoxin und Cicutoxin.

Ein ganz anderes Vergiftungsbild als das Strychnin ruft das zweite toxikologisch wichtige Krampfgift, das Pikrotoxin, hervor, welches mit Strychnin, Brucin, Chinin und Pikrinsäure den bitteren Geschmack teilt.

In Fig. 24 sind Frösche in mehreren Stellungen abgebildet, wie sie für die Pikrotoxinvergiftung typisch sind. Im Gegensatz zur Streckstellung

Fig. 24.



Rana esculenta. Pikrotoxinstellungen.

im Strychninkrampf beobachtet man hier Überwiegen der Innervation der Beuger an den Hinterbeinen.

[1]) *R. Kobert*, Lehrbuch der Intoxikationen. Bd. 1. Stuttgart 1902. S. 191. — Derselbe, Über die Bedeutung des biologischen Giftnachweises für die gerichtliche Medizin. Ber. d. Deutsch. pharmazeut. Gesellsch. Bd. 13. S. 330 (1903).

[2]) *C. Focke*, Die Heranziehung physiologischer Versuche zum qualitativen und quantitativen Nachweis krimineller Strychninvergiftung. Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Medizin. 3. Folge. Bd. 37. S. 28 (1909).

An mittelgroßen Wasserfröschen (etwa 50 *g*) hat eine Dose von **1/10 *mg*** Pikrotoxin keine Wirkung.

2/10 *mg* zeigt eine erst nach mehreren Stunden deutlich werdende Wirkung, welche darin besteht, daß das Tier sich nicht mehr auf seine Vorderbeine stützt und die Hinterbeine schon vorwiegend in Beugestellung hält. Zugleich beobachtet man Dehnung der Schwimmhäute. Die Stellung wird auf Reizung des Tieres mehr ausgeprägt. Der Thorax ist gebläht. Spontane Bewegungen werden kaum ausgeführt. Krämpfe treten bei dieser Dose noch nicht auf. Noch nach 24 Stunden besteht bei den Tieren Steifigkeit und Disposition zur Einnahme der charakteristischen „Pikrotoxinstellung".

5/10 *mg*. Etwa $^3/_4$ Stunden nach der Injektion tritt der erste Krampfanfall auf, nachdem vorher schon die charakteristische Stellung eingenommen wurde. Im Krampfanfall können die Tiere auf den Rücken geschleudert werden und von hier wieder in die Bauchlage. Plötzliche Entleerung der Luft aus dem geblähten Thorax unter starkem Schrei wird bei dieser Pikrotoxindose meist noch nicht beobachtet. Die Krämpfe halten mehrere Stunden an und nehmen allmählich an Intensität ab. Auch die Pikrotoxinstellung ist weniger ausgesprochen wie zu Anfang. Werden die Frösche mit Wasser abgespült und in solchem aufbewahrt, so können sie am anderen Tag noch leben, sind aber meist noch gelähmt. $^5/_{10}$ *mg* Pikrotoxin ist für mittelgroße Frösche etwa die tödliche Grenzdose.

1 *mg*. Nach einer halben bis einer Stunde stellen sich nach dem Prodromalstadium Krämpfe ein, die anfangs tetanischen Charakter haben können. Meist noch später kommen spontan oder häufig noch besser auf Reizung sehr starke Krampfanfälle zur Beobachtung, die durch starke Blähung des Thorax und dessen plötzlich erfolgende Entleerung verbunden mit starkem Schrei (namentlich bei männlichen Fröschen) ausgezeichnet sind. Krämpfe mit und ohne Schrei können sich noch mehrere Stunden lang wiederholen. Sie werden allmählich schwächer und schließlich stirbt das völlig gelähmte Tier. Erholung nach so starker Pikrotoxinvergiftung der Frösche ist selten. Bemerkenswert an der Pikrotoxinvergiftung des Frosches ist der langsame Verlauf selbst bei tödlichen Dosen.

Bei Vorhandensein von genügend Material kann neben dem Versuch am Frosche ein solcher an kleinen Fischen ausgeführt werden. Nach *Dragendorff*[1]) sterben kleine Karpfen von 0·5—0·7 *g* Gewicht in Wasser, welches auf **250 *cm*^{3} 10 *mg*** Pikrotoxin enthält, nach $2^1/_2$ Stunden. Mit **5 *mg*** nach 7, mit **1 *mg*** nach etwa 9, mit **0·4—0·6 *mg*** nach etwa 16 und mit **0·2 *mg*** nach etwa 24 Stunden. Nach *Goupil*[2]) sind von Süßwasserfischen gegen Pikrotoxin am empfindlichsten die Plötze, weniger Döbel, Blei, Barsch und Schleihe, am wenigsten die Barbe.

[1]) *Gg. Dragendorff*, Die gerichtlich-chemische Ermittlung von Giften. Göttingen 1895. S. 344.

[2]) *Ch. Vibert*, Précis de Toxicologie. Paris 1907. p. 540.

Zum Nachweis von Pikrotoxin eignen sich auch die gegen das Gift sehr empfindlichen Crustaceen. Nach *Planat*[1]) sterben Flußkrebse, denen 1/2 *mg* Pikrotoxin injiziert wurde, nach 5 Minuten unter den heftigsten Krämpfen, während sie gegen Strychnin sehr widerstandsfähig sind.

Das **Cicutoxin** besitzt am Frosche genau dieselbe Wirkung wie das Pikrotoxin.

Auch hier pflegt den Krampferscheinungen nach *Boehm*[2]) ein Prodromalstadium mit charakteristischer Beinstellung vorauszugehen. Nach Dosen von **1—3** *mg* treten nach 20 Minuten bis 1½ Stunden die Krämpfe auf mit anfänglich starkem Schrei. Schließlich folgt allgemeine Lähmung und Tod oder Erholung des Tieres. Erholung nach schweren Krämpfen erfolgt beim Cicutoxin häufiger als beim Pikrotoxin. Der Verlauf der Cicutoxinvergiftung am Frosch ist ein noch langsamerer als derjenige der Pikrotoxinvergiftung.

Erwähnt sei noch, daß nach *Boehm*[3]) auch die Barytsalze am Frosche ähnliche Vergiftungssymptome wie Pikrotoxin und Cicutoxin hervorrufen.

3. Der Nachweis von Nicotin.

Durch das Nicotin kann fast ebenso schnell wie durch die Blausäure der Tod von Warmblütern herbeigeführt werden. Auch die Vergiftungserscheinungen am Frosch treten rasch auf. Von den zahlreichen Wirkungen des Nicotins ist namentlich eine zu seinem Nachweis unter Verwendung des Frosches geeignet, welche außer dem Nicotin keinem anderen, ihm toxikologisch-chemisch oder in seiner Wirkung nahestehenden Gifte zukommt: eine Wirkung, die zentral bedingt ist, und darin besteht, daß der Frosch nach Injektion von Nicotinlösungen schon nach wenigen Minuten in sitzender Stellung die Hinterbeine über dem Rücken in die Höhe zieht, so daß sich die Fersen einander nähern, bei stärkerem Grade der Wirkung sich berühren, oder die Beine sich sogar über dem Rücken kreuzen (vgl. Fig. 25).

Die Erscheinungen, welche salzsaures Nicotin an Wasserfröschen von etwa 30 *g* hervorruft, sind folgende:

1/10 *mg*. Wenige Minuten nach der Injektion in den Brustlymphsack sistiert die Atmung. An Stelle der Atembewegungen beobachtet man Flimmern und Zittern der Flanken. Das Tier sitzt bewegungslos, mit angezogenen Hinterbeinen, welche etwas über den Rücken emporgehoben sind. Die Fersen berühren sich aber bei dieser Dose nicht. Die Hinterbeine werden fester als normal an den Rücken angedrückt. Diagnostisch verwertbar ist die Haltung der Wasserfrösche nach Injektion von nur $^{1}/_{10}$ *mg*

[1]) *Ch. Vibert*, Précis de Toxicologie. Paris 1907. p. 540.

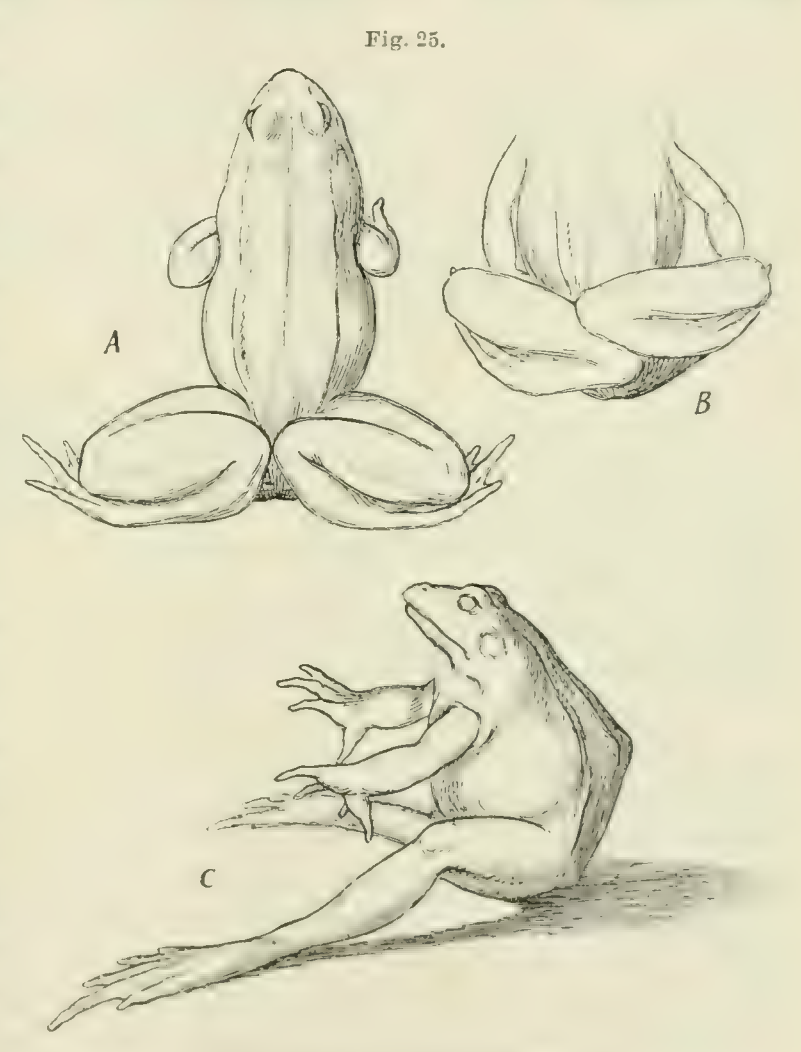
[2]) *R. Boehm*, Über den giftigen Bestandteil des Wasserschierlings (Cicuta virosa) und seine Wirkungen; ein Beitrag zur Kenntnis der Krampfgifte. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 5. S. 289 (1876).

[3]) *R. Boehm*, Über die Wirkungen der Barytsalze auf den Tierkörper. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 3. S. 216 (1875).

Nicotinchlorhydrat nicht. Am auffallendsten nach dieser kleinen Dose ist die in etwa 5 Minuten eintretende Bewegungslosigkeit und der Atmungsstillstand des Tieres. Diese Erscheinungen währen im Durchschnitt eine Stunde. Dann ist die Atmung zurückgekehrt und das Tier bewegt sich wieder normal.

2/10 *mg*. Bald nach Injektion dieser Menge tritt Atmungsstillstand ein. Dann beobachtet man wieder Bewegungslosigkeit des Tieres. Flimmern der Flanken und hier schon regelmäßig das etwa nach 5 Minuten erfolgende Emporziehen der Hinterbeine über den Rücken. Man kann die typische Stellung noch deutlicher zur Geltung bringen, wenn man die Beine des Frosches über seinem Rücken in die Höhe schiebt. Sie werden dann hier festgehalten. Weniger charakteristisch für die Nicotinwirkung als die Beeinflussung der Stellung der Hinterbeine in der angegebenen Weise ist eine solche der Vorderbeine. Diese werden meist nach unten an den Bauch angelegt. Allmählich sinken die in abnormer Haltung befindlichen Hinterbeine in die Normalhaltung zurück. Nach 2 bis 3 Stunden kehren Atmung und spontane Bewegungen wieder.

Fig. 25.



Rana esculenta. Nicotinstellungen.

5/10 *mg*. Hier sind die geschilderten Erscheinungen noch ausgeprägter und die Erholung erfolgt später.

1 *mg*. Schon nach 1—2 Minuten tritt Atmungsstillstand und Flimmern der Flanken auf. Nach 3 Minuten beginnt das Emporziehen der Hinterbeine über den Rücken, während die Vorderbeine noch in normaler Stellung sich befinden. Nach etwa 5 Minuten erträgt der Frosch Rückenlage und die Vorderbeine sind nunmehr an den Leib nach unten angelegt. Nach 10 Minuten ist das Flimmern der Flankenmuskulatur vorüber und die Beine werden weniger kräftig über dem Rücken emporgezogen. Die typische Haltung der Hinterbeine ist bei dieser Dose in etwa 30 Minuten vorüber

und die Hinterbeine erschlaffen. Die Muskulatur des Tieres nimmt bei dieser und größeren Nicotingaben einen eigentümlichen Zustand der Steifheit an, so daß man den Frosch in Körperstellungen, wie sie Fig. 25 *C* wiedergegeben, bringen kann, welche lange Zeit beibehalten werden. Von genannter Dose erholen sich die Frösche regelmäßig wieder.

Auch an Grasfröschen ruft das Nicotin die typische Beinstellung hervor, sogar schon in Dosen von **1/10 *mg*.** Doch ist die Erscheinung bei den etwas weniger empfindlichen Wasserfröschen besser zu beobachten.

Wichtig ist, daß namentlich dem Coniin, welches bei dem Gang der toxikologischen Analyse gleichzeitig mit dem Nicotin ausgeschüttelt wird, die hier beschriebene Wirkung auf den Frosch vollständig fehlt. Ebenso fehlt sie dem Pilocarpin und dem synthetischen Muscarin. Dies ist insofern beachtenswert, als am isolierten Muskel das Muscarin und in schwächerem Maße auch das Coniin tonische Kontraktion wie das Nicotin hervorrufen.

4. Der Nachweis von Colchicin.

Die biologischen Reaktionen, welche für das Colchicin bekannt sind, genügen allein nicht, das Gift mit Sicherheit nachzuweisen. Aber die kombinierte Verwendung chemischer und biologischer Reaktionen ermöglicht dieses.

Die Frösche sind, wie *Jakobj*[1]) gezeigt hat, gegen reines Colchicin auffallend wenig empfindlich.

10 *mg* mittelgroßen Wasserfröschen in den Brustlymphsack injiziert, bleiben ohne jede Wirkung.

20 *mg*. Nach einigen Stunden zeigen sich schwache zentrale Wirkungen. Legt man den Frosch auf den Rücken, so dreht er sich wiederholt um, ermüdet dann aber und erträgt längere Zeit Rückenlage. Bei männlichen Tieren ist beim Streichen über den Rücken leicht der sogenannte „Quakreflex" auszulösen. Spontan bewegt sich der Frosch nicht, verhält sich also wie ein Tier, dem das Großhirn zerstört wurde. Bei regelmäßigem Abspülen erholt sich der Frosch in 2—3 Tagen wieder völlig.

40 *mg*. Etwa eine Stunde nach der Injektion erträgt das Tier zeitweise Rückenlage und befindet sich in einem Zustand leichter Narkose. Nach 2 Stunden erscheint die Bauchhaut gerötet. 24 Stunden nach der Injektion erträgt der Frosch lange Zeit hindurch Rückenlage. Thoraxatmung fehlt und Kehlbewegung ist selten. Bei Berührung der Flanken tritt Thoraxblähung und Exspiration unter Quaken ein. Spontan bewegt sich der Frosch nicht. Nach 2—3 Tagen bemerkt man wieder bessere Beweglichkeit und auch die Atmung wird wieder sichtbar. Trotz dieser anfänglichen Remission erfolgt keine völlige Erholung. Fortschreitende zentrale

[1]) *C. Jakobj,* Pharmakologische Untersuchung über das Colchicumgift. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 27, S. 125 (1890).

Lähmung macht sich mehr und mehr geltend. Nach etwa einer Woche kann das Tier sich nicht mehr aus der Rückenlage umwenden, die Reflexe (Anziehen der Beine auf Kneifen der Zehen) sind aber noch erhalten. Später kann der Frosch nicht mehr normal sitzen. Die Beine gleiten aus und das Tier liegt auf dem Bauche. Nach etwa 2 Wochen hat die Haut, welche schon längere Zeit hindurch dunkel war, wachsartigen Glanz angenommen („Wachshaut"). Die Reflexe verschwinden dann immer mehr und mehr, meist zuletzt der Kornealreflex. Öffnet man bei dem völlig reflexlosen Tier den Thorax, so findet man das Herz noch kräftig schlagend.

Diese Angaben über die Wirkung des Colchicins sind nach Beobachtungen an gesunden Wasserfröschen gemacht, und zwar wurden die Versuche bei Zimmertemperatur (15—18°) angestellt. Mit steigender Temperatur nimmt die Giftigkeit des Colchicins für Frösche außerordentlich zu (*Fühner*[1]). Gesunde kleine Wasserfrösche (ohne Hautdefekte) lassen sich bei einer Temperatur von 30—32° mehrere Wochen im Thermostaten halten, wenn man sie täglich mit Wasser, welches bei derselben Temperatur gehalten wird, abspült. Injiziert man Fröschen, welche 5 bis 6 Tage bei dieser Temperatur gehalten wurden und hier sich normal befanden — die Tiere führen bei diesen Temperaturen sehr lebhafte Bewegungen aus — Colchicindosen von **0·1—1 *mg***, so sterben sie im Verlauf von 2—5 Tagen unter den Erscheinungen fortschreitender zentraler Lähmung, wie sie bei großen Colchicindosen in der Kälte auftreten und hier sich sehr langsam entwickeln. Die Giftigkeit des Colchicins ist bei dieser Temperatur für die Frösche annähernd 500mal höher als bei Zimmertemperatur.

Zum Nachweis von Colchicin unter Verwendung von Fröschen kann man in der Weise vorgehen, daß man das verdächtige, die chemische Colchicinprobe gebende, möglichst gereinigte Material einem bei Zimmertemperatur gehaltenen Wasserfrosche von 25—30 *g* injiziert und diesen in etwas Wasser, das täglich öfters gewechselt wird, 2 Tage sitzen läßt. Das Wasser, in welches der Frosch Harn und Kot entleerte, wird filtriert und eingedampft und kann wieder zu chemischen und biologischen Proben (Versuch an der weißen Maus) dienen, da das Colchicin vom Frosche in wirksamer Form wieder im Harn ausgeschieden wird. Hat der Frosch 2 Tage hindurch bei Zimmertemperatur keine Vergiftungserscheinungen gezeigt — Mengen, bei denen der Frosch schon in der Kälte Wirkungen zeigt, werden in forensisch-toxikologischen Fällen wohl nie vorhanden sein — so verbringt man ihn zugleich mit mehreren Kontrollfröschen derselben Größe in den Thermostaten von 30—32°. Sind Colchicinmengen von **1 *mg*** und darüber dem Tiere injiziert worden, so stirbt es im Thermostaten im Verlauf von 2—3 Tagen, bei geringeren Mengen tritt der Tod häufig erst nach 4 Tagen und später ein. Die Kontrollfrösche müssen in derselben

[1]) *H. Fühner*, Über den toxikologischen Nachweis des Colchicins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 63. S. 365 (1910).

Zeit durchaus normal bleiben. Bei Vorhandensein von genügend Material wird man zweckmäßig zur Bestätigung der ersten Probe noch einen Frosch injizieren, welcher schon einige Zeit im Thermostaten gehalten wurde.

Als charakteristisch für das Colchicin und für den biologischen Nachweis am Frosche verwertbar ist demnach seine geringe Giftigkeit bei niederer Temperatur und seine außerordentlich gesteigerte Giftigkeit bei höheren Temperaturen. Andere Gifte, welche beim Gange der toxikologischen Analyse zugleich mit dem Colchicin in die Ausschüttelungsflüssigkeiten übergehen können, wie Pikrinsäure, Pikrotoxin, Strophanthin, Digitoxin und Veratrin, zeigen derartige Differenzen nicht. Bei Zimmertemperatur unwirksame Mengen dieser Gifte sind auch bei 30—32° nicht imstande, den Tod von Fröschen herbeizuführen.

Zur weiteren biologischen Charakterisierung des Colchicins können Versuche an der weißen Maus (s. d.) oder Katze angestellt werden.

5. Der Nachweis von Guanidin und Methylguanidin.

Das Guanidin selbst besitzt keine forensisch-toxikologische Bedeutung, hingegen kommt solche dem Methylguanidin zu, welches nach *Achelis*[1]) als normaler Bestandteil des Harns vorkommt und nach *Brieger*[2]) bei der Fäulnis von Fleisch sich bildet. Injiziert man Fröschen Auszüge von Leichenteilen, so können demnach Wirkungen des Methylguanidins oder Guanidins, welche bei beiden Substanzen die gleichen sind, auftreten. Die Kenntnis derselben ist darum für den Gerichtsarzt und Gerichtschemiker wichtig.

Zur Prüfung sind kleine lebhafte, möglichst frisch gefangene Wasserfrösche (oder auch Grasfrösche) von 20—30 *g* geeignet.

Vom salzsauren Guanidin ist für kleine Wasserfrösche **1 *mg*** die unterste Grenze, bei welcher noch charakteristische Wirkungen am ganzen Tier beobachtet werden können. Doch meist undeutlich.

2 *mg* sind am normalen Frosche im allgemeinen deutlich wirksam. Etwa 20 Minuten nach der Injektion in den Brustlymphsack beobachtet man bei der Atmung des Tieres eine eigentümlich wogende Bewegung der Flanken. Nach dieser Zeit und oft schon früher treten sogenannte fibrilläre (faszikuläre) Zuckungen in der Nähe der Injektionsstelle auf, also zunächst an den Vorderbeinen und der Bauch- und Seitenmuskulatur, später auch in der Muskulatur des Rückens. Sehr auffällig sind auch die sich unter der Einwirkung des Guanidins einstellenden Bewegungen des Augapfels. Zuckungen in der Muskulatur des Oberschenkels erfolgen erst später, etwa nach $^{3}/_{4}$—1 Stunde. Bei diesen kleinen in den Brustlymphsack injizierten Dosen beobachtet man meist kein Fortschreiten derselben bis zu den Füßen. Erst bei größeren Dosen.

[1]) *W. Achelis*, Über das Vorkommen von Methylguanidin im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 50. S. 10 (1906/1907).

[2]) *L. Brieger*, Untersuchungen über Ptomaine. 3. Teil. Berlin 1886. S. 34.

Diese eigentümliche Wirkung des Guanidins ist eine rein lokale Wirkung auf den mit der Substanz in Berührung kommenden Muskel bzw. die motorischen Nervenenden in dem Muskel, welche durch das Guanidin erregt werden. Das progressive Vordringen des Guanidins läßt sich am besten bei Injektion in den Lymphsack des Oberschenkels verfolgen, wobei die Guanidinzuckungen längere Zeit auf die injizierte Körperseite beschränkt bleiben.

Die Erscheinungen nach 2 *mg* Guanidiniumchlorid bleiben mehrere Stunden lang ungeschwächt bestehen. Nachdem sie schon nachgelassen, treten sie beim Abspülen des Frosches wieder verstärkt auf. Zu erwähnen ist noch die bei dieser Dose schon zur Beobachtung gelangende Blähung des Thorax. Rückenlage erträgt der Frosch nicht. 24 Stunden nach der Injektion ist das Tier wieder völlig normal.

Während solch kleine Guanidindosen nur die motorischen Nervenenden in den Skelettmuskeln erregen, besitzen große Dosen auch zentral erregende Wirkung, die sich in krampfhaften Zuckungen der Beine äußert. Auf die zentrale Erregung folgt zentrale Lähmung, bei welcher der Frosch reflexlos wird. In diesem Stadium sind anfänglich vom freigelegten Nervus ischiadicus (über dessen Präparation und Reizung vgl. beim Nachweis von Curarin) aus durch elektrische Reizung noch Zuckungen der zugehörigen Beinmuskeln auszulösen. Endlich werden aber auch die durch das Guanidin zuerst erregten motorischen Nervenenden nach Art des Curarins gelähmt (*Fühner*[1]), so daß elektrische Reizung des N. ischiadicus ohne Erfolg bleibt, während direkte Muskelreizung noch wirksam ist. Durch Guanidin zentral und peripher gelähmte Frösche erholen sich meist nicht mehr.

Zum Nachweis des Guanidins und Methylguanidins dient lediglich die erregende Wirkung auf das motorische Nervenende. Diese Wirkung kann am isolierten Muskel (s. d.) auch graphisch registriert werden.

Zuckungen von ähnlicher Intensität, wie sie Guanidin und Methylguanidin am Frosche hervorbringen, verursacht auch das toxikologisch nicht in Betracht kommende Tetraäthylammoniumchlorid, dann aber von Alkaloiden namentlich auch das Nicotin. Bei diesem treten die Zuckungen schnell nach der Injektion auf und gehen sehr rasch vorüber. In geringerem Maße kommt diese Wirkung auch bei Injektion von Aconitinlösungen zur Beobachtung. Physostigmin, welches eine ähnliche Erscheinung am Warmblüter hervorruft, ist in dieser Hinsicht am Frosche unwirksam. Eine Verwechslung des Guanidins oder Methylguanidins mit den tertiären Alkaloiden Aconitin und Nicotin auf Grund dieser Muskelwirkung ist dadurch ausgeschlossen, daß bei Ausschüttelung mit Chloroform und Äther letztere aufgenommen werden, das Guanidin aber, wie das Curarin, Muscarin und andere quartäre Ammoniumverbindungen, zurückbleibt.

[1]) *H. Fühner*, Curarestudien. I. Die periphere Wirkung des Guanidins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 58, S. 26 (1907).

6. Der Nachweis von Veratrin.

Der Veratrinnachweis gelingt am ganzen Frosche noch gut mit **1/100** ***mg*** Substanz, während **1/1000** ***mg*** unwirksam ist.

Das salzsaure Veratrin mittelgroßen Wasserfröschen (bis zu 50 *g*), welche bei Zimmertemperatur gehalten werden, in den Brustlymphsack injiziert, hat folgende Wirkungen.

1/100 ***mg***. 10 Minuten nach der Injektion springt der Frosch unbeholfen. 20 Minuten nachher ist schon deutliche Veratrinwirkung vorhanden, dadurch charakterisiert, daß der erste Sprung des Tieres, welcher nicht spontan, sondern nur auf Reizung ausgeführt wird, sehr steif und ungeschickt ausfällt, während die sich an diesen anschließenden Sprünge bald wieder normal sind. Dieser „Veratrineffekt" entwickelt sich allmählich noch besser. Reizt man den ruhig sitzenden Frosch nach ungefähr einer Stunde etwa durch Kneifen der Zehen, so erfolgt mühsam unter Dehnung und Streckung der Glieder endlich der erste schwerfällige Sprung. Der zweite Sprung wird auf Reizung schon leichter und gewandter ausgeführt und bald bewegt sich das Tier wieder normal. Läßt man es 10 Minuten sitzen, so ist die Erscheinung von neuem in typischer Weise auszulösen. Rückenlage erträgt der Frosch nach dieser kleinen Dose nicht. Abgesehen von der genannten Muskelwirkung sind keine Vergiftungserscheinungen vorhanden. Die Muskelwirkung hält meist einen Tag lang an.

5/100 ***mg***. Der typische Veratrineffekt ist bei Mengen von **3—6/100** ***mg*** des salzsauren Salzes am besten ausgeprägt. Besser als bei kleinen Dosen tritt hier auf Reizung namentlich die rasch erfolgende Streckung der Hinterbeine und die sehr langsam verlaufende Beugung zutage. Der größeren Dose entsprechend dauert die Erscheinung hier längere Zeit an.

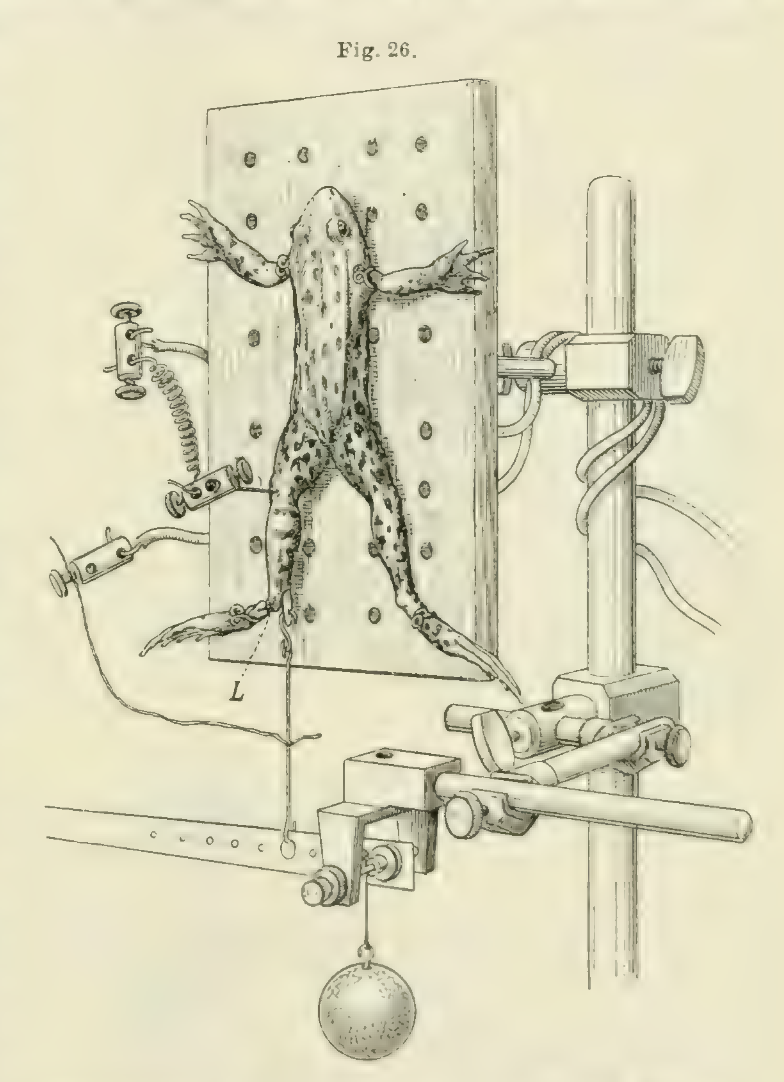
1/10 ***mg***. Hier sind auch schon neben der Muskelwirkung Erscheinungen zentraler Erregung und Lähmung vorhanden. Die auffällige Streckung der Hinterbeine bei Sprüngen, welche einige Zeit nach der Injektion ausgelöst werden, hat schon tetanischen Charakter. Nach 20 Minuten erträgt das Tier Rückenlage. Nach einer Stunde ist es reflektorisch nur schwer zu erregen und die Muskulatur zeigt eine eigentümliche Steifheit, wie sie auch nach größeren Dosen von Nicotin (s. d.) auftritt, so daß der Frosch beliebig erteilte Stellungen der Beine beibehält. Von dieser Dose erholt sich das Tier im Verlaufe einiger Tage wieder, vor der vollständigen Erholung ein Stadium mit typischer Muskelwirkung, wie nach den kleineren Dosen, durchlaufend.

Tödlich sind Dosen von **5/10—1** ***mg***, nach denen der charakteristische Veratrineffekt nicht mehr deutlich zur Geltung kommt und von Anfang an Lähmungserscheinungen in den Vordergrund treten.

Der Veratrinzustand der Frösche kann leicht graphisch registriert werden. Zu diesem Zwecke zerstört man bei dem Tiere, nachdem die Erscheinung deutlich ausgeprägt ist, das Gehirn mit einer starken Nadel (oder dem spitzen Blatt einer kleinen Schere), welche in der Mittel-

linie des Körpers in der Höhe des hinteren Endes der beiden freiliegenden Trommelfelle eingebohrt wird. Die richtige Stelle findet man leicht, wenn man mit der Nadel über dem Schädel genau in der Mitte nach dem Rücken zu streicht. Am Ende des Kopfes, an der erwähnten Stelle, fühlt man eine Vertiefung, in welche man die Nadel einbohrt und sie dann in den Schädel vorschiebt, in dem man durch Hin- und Herbewegen das Gehirn zerstört. Ist die Operation gelungen, so erträgt der Frosch nach derselben Rückenlage. Ein kleiner Blutverlust aus der Einstichstelle ist belanglos.

Fig. 26.



Rana esculenta. Versuchsanordnung zur elektrischen Reizung des Musculus gastrocnemius.

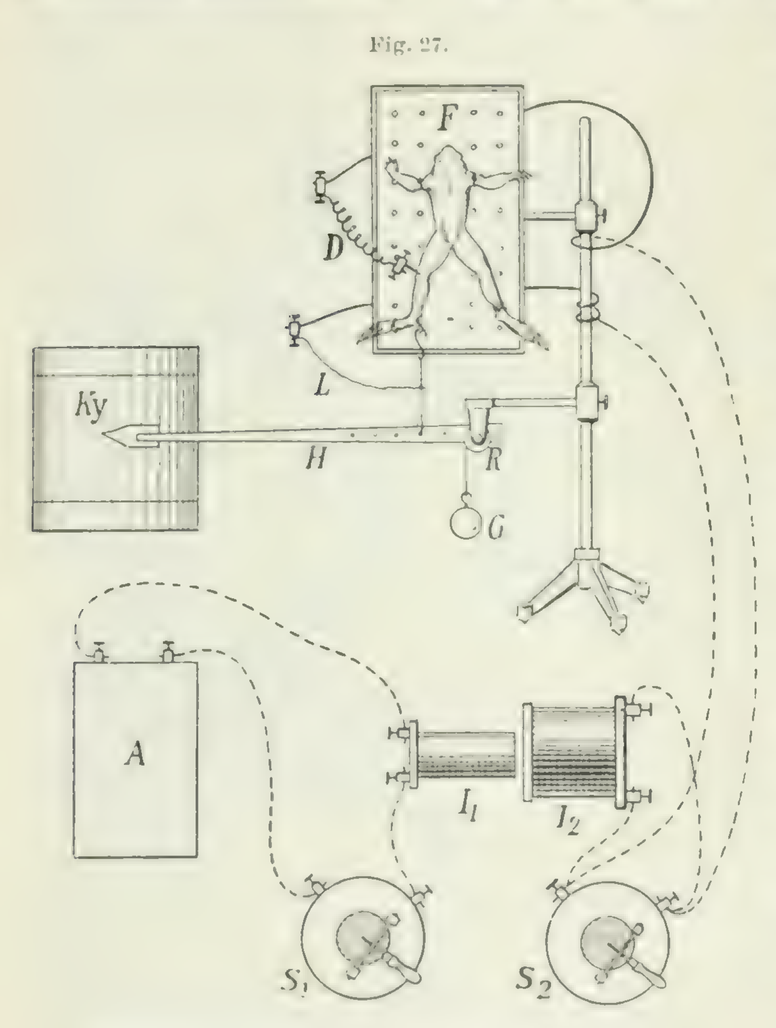
Der Frosch wird nun auf dem gestielten Froschbrett in Bauchlage mit vier Klammern fixiert, worauf an einem Beine die Achillessehne freipräpariert werden muß. (Vgl. Fig. 26.) Nach Anlegung eines Hautschnittes in der Fersengegend, wodurch die Achillessehne sichtbar wird, sticht man mit einer gebogenen, mit Faden versehenen chirurgischen Nadel dicht unter der glänzenden Sehne durch und knüpft den Faden um den Fuß (vgl. Fig. 26 *L*), um Blutungen aus Gefäßen, welche dicht unter der Sehne liegen und bei deren Präparation leicht verletzt werden, zu vermeiden. Dann präpariert man die an ihrem unteren Ende abgeschnittene Sehne ein Stück weit nach oben frei, durchsticht sie (mit dem spitzen Blatt einer feinen Schere) und bringt an ihr einen Haken an, welchen man, nachdem das Froschbrett in vertikaler Stellung im Stativ befestigt worden ist, nach unten hin mit dem Schreibhebel durch einen Draht verbindet. Die Achse des Schreibhebels wird mit etwa 50 *g* belastet (Fig. 26).

An dem Frosche soll nun der Musculus gastrocnemius, in welchen die Achillessehne nach oben hin übergeht, elektrisch gereizt werden. Die Anordnung hierzu ist aus Fig. 26 und Fig. 27 gut ersichtlich. Die eine Stromzuführung kann durch einen am besten erst in kleiner Flamme ausgeglühten Lamettafaden (Fig. 27 *L*) zu dem Drahte geschehen, welcher

Sehne und Schreibhebel verbindet. Die zweite Zuleitung erfolgt durch einen Draht (Fig. 27 *D*), welcher zu einer Klemmschraube führt, die von einer starken, das Knie des Frosches durchbohrenden Nadel getragen wird. Die Nadel dient zugleich zur Fixierung des Froschbeines auf dem Froschbrett. Viel bequemer für diesen Reizungsversuch ist die Verwendung des früher (S. 33) erwähnten Froschbrettes nach *Boehm*.

Der Froschmuskel soll nun rhythmisch alle 4 oder 5 Sekunden mit Einzelinduktionsschlägen von gleicher Stärke gereizt werden. Da die Öffnung des Stromes wirksamer ist als dessen Schließung, so kann nur mit Öffnungs- oder mit Schließungsschlägen gereizt werden.

Fig. 27.



Versuchsanordnung zur Abblendung der Öffnungs- oder Schließungsinduktionsschläge.

Zur „Abblendung“ der einen oder anderen Art von Schlägen existieren mechanische Vorrichtungen, wie eine solche S. 40 angegeben ist. Für den Veratrinnachweis ist diese Apparatur überflüssig. Man kann hier manuell nach der Uhr rhythmisch reizen unter Verwendung von 2 Quecksilberschlüsseln zur Abblendung, welche, wie aus Fig. 27 ersichtlich, in den primären und sekundären Stromkreis eingeschaltet werden.

Will man den Frosch mit Schließungsschlägen reizen, so schließt man von den anfänglich offenstehenden Schlüsseln erst S_1. Hierbei zuckt der Gastrocnemius. Dann schließt man S_2, öffnet S_1 und dann wieder S_2, was alles keine Zuckung auslöst.

Um mit Öffnungsschlägen zu reizen, schließt man zuerst S_2, was wirkungslos bleibt, dann S_1, gleichfalls ohne Wirkung. Öffnet dann S_2, wieder ohne Wirkung und endlich S_1, wobei der Muskel zuckt. Dieses Spiel der Schlüsselhebel wird regelmäßig wiederholt. Für den Veratrinnachweis ist es gleichgültig, ob man Öffnungs- oder Schließungsschläge zur Reizung verwendet.

Reizt man einen normalen Froschgastrocnemius mit einem wirksamen Induktionsschlag, so führt dieser eine Zuckung aus. Bei graphischer

Registrierung unter Verwendung einer Umdrehungsgeschwindigkeit des Kymographions von etwa 1·5 *cm* in der Sekunde erhält man Kurven mit einem Gipfelpunkt, wie solche in Fig. 40 *a* wiedergegeben sind. Unter diesen Kurven ist die Zuckung eines Muskels nach Veratrinvergiftung aufgezeichnet (Fig. 40 *b*), dadurch auffallend, daß die Kurve hier 2 Gipfelpunkte besitzt. Ähnlich wie diese am isolierten Froschmuskel aufgenommenen Kurven sehen diejenigen aus, welche man vom ganzen Frosch nach Veratrinvergiftung erhält. Reizt man den Frosch regelmäßig alle 4—5 Sekunden, so verschwindet allmählich der zweite Gipfel der Zuckung und nach 10—20maliger Reizung zeichnet der Muskel normale Zuckungen auf. Nach einer Pause von mehreren Minuten läßt sich eine neue Serie charakteristischer Kurven aufnehmen. Fig. 38 zeigt eine derartige, ebenfalls am isolierten Muskel gewonnene Kurvenreihe, bei langsamerem Trommelgang (1 *mm* pro Sekunde) und unter Reizung mit 4-Sekundenöffnungsschlägen aufgenommen.

Gibt eine Substanz oder ein bei der toxikologisch-chemischen Analyse erhaltener Rückstand die chemischen Reaktionen des Veratrins, so ist von vornherein vorzuziehen, die biologische Prüfung auf das Gift nicht am ganzen Frosch, sondern am isolierten Froschmuskel vorzunehmen, in der Weise, wie weiter unten angegeben.

Erwähnung verdient, daß ein von *Jacobj*[1]) durch Oxydation von Colchicin erhaltenes, von ihm Oxydicolchicin genanntes Produkt an Fröschen veratrinähnliche Wirkung hat, und daß solche Wirkung nach *Santesson*[2]) auch durch größere Dosen von Glyzerin hervorgerufen werden kann.

7. Der Nachweis von Curarin, Coniin und von anderen Substanzen mit Curarinwirkung.

Wenn auch die toxikologische Bedeutung des reinen Curarins, von welchem gutes Kalebassencurare etwa 10% enthält, eine nur geringe ist, so muß doch der biologische Nachweis desselben hier besprochen werden, da Curarinwirkung einer großen Gruppe von Substanzen zukommt.

Während sich bei Vergiftungen von Fröschen mit Substanzen, die zentral oder peripher erregend wirken, oft ein charakteristisches Vergiftungsbild entwickelt, ist dies bei Substanzen, welche von Anfang an zentral oder peripher lähmend wirken, nicht der Fall.

Injiziert man einem Frosche ein Gift, welches zentral lähmt, z. B. ein Narcoticum wie Urethan in Menge von 0·2 *g* in 2 cm^3 in den Brustlymphsack, so beobachtet man nichts weiter, als daß das Tier sich nach

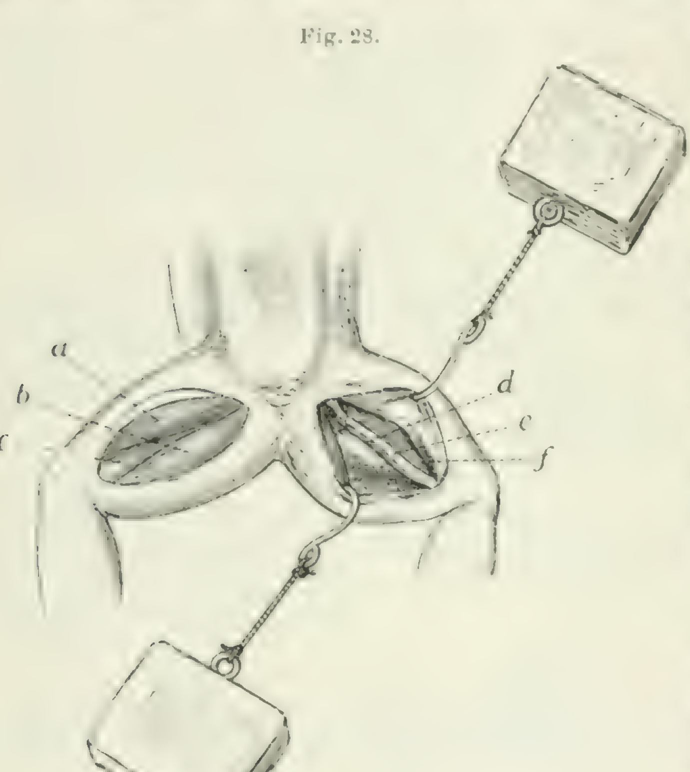
[1]) *C. Jacobj*, Pharmakologische Untersuchung über das Colchicumgift. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 27. S. 141 (1890).

[2]) *C. G. Santesson*, Einiges über die Wirkung des Glyzerins und des Veratrins auf die quergestreifte Muskelsubstanz (Frosch). Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 14. S. 1 (1903).

5—10 Minuten nicht mehr aus der Rückenlage umzudrehen vermag, daß auch die Atembewegungen des Thorax meist eingestellt sind, während der Herzschlag noch deutlich an rhythmischen Bewegungen der Brustwand zu erkennen ist. Reflexbewegungen sind am Anfang auf Kneifen der Beine noch auszulösen, bald ist aber völlige Reflexlosigkeit eingetreten.

Denselben nur etwas langsameren Verlauf nimmt die Vergiftung bei einem Frosche, welchem man eine genügende Dose Curarin ($^2/_{100}$ *mg* oder $^2/_{10}$ *mg* gutes Kalebassencurare) injiziert hat, welches im Gegensatz zum Urethan den Frosch nur peripher lähmt, und zwar hier die motorischen Nervenenden in den Skelettmuskeln.

Fig. 28.



Freilegung des Nervus ischiadicus.

Beide Frösche sind ohne eingehendere Prüfung nicht voneinander zu unterscheiden. Der durchgreifende Unterschied beider Vergiftungen läßt sich aber leicht unter Zuhilfenahme von elektrischer Reizung feststellen. Zu dem Zwecke präpariert man den Nervus ischiadicus, den Hauptnerv des Froschbeines.

Man bringt dazu den bewegungslosen Frosch in Bauchlage und legt mit einem Scherenschnitt in der Mitte eines Oberschenkels (vgl. Fig. 28) dessen Muskulatur frei. Beim Auseinanderziehen der Haut treten, zum Teil noch von einer feinen Haut (Faszie) bedeckt, 3 Muskeln hervor: Der Musculus glutaeus magnus *(a)*, der Musculus semimembranosus *(b)* und zwischen beiden der Musculus ileofibularis *(c)*. Der Nerv liegt in der Tiefe zwischen M. semimembranosus und M. ileofibularis. Spaltet man die zwischen beiden Muskeln liegende Faszie vorsichtig, so lassen sich die Muskeln mit einer Pinzette leicht auseinanderschieben und der Nerv erscheint als glänzender weißer Strang *(e)*, begleitet von der schwarzen Arterie *(d)*, welche ihn zum Teil überbrückt. Bei weiterem Auseinanderziehen der Muskulatur kommt seitlich noch die Hauptvene des Beines *(f)* zum Vorschein.

Unter den Nerven schiebt man schonend eine feine Pinzette, wobei man sucht, dieselbe zwischen Arterie und Nerv durchzuführen. Ist dies gelungen, so kann man durch Verschieben der Pinzette nach rechts und links den Nerven in einer Ausdehnung von 1 *cm* und mehr frei über der

Pinzette liegend erhalten. Von hier aus legt man ihn über die umgebogenen Enden der Reizelektrode (Fig. 20 *E*), was alles ohne Zerrung des empfindlichen Nerven geschehen muß.

Bei dem Urethanfrosch wird man bei größtem Rollenabstand des Induktionsapparates bei tetanisierender Reizung Zuckung im Unterschenkel und Fuße auslösen können. Bei dem mit Curarin vergifteten Frosche, sobald die Wirkung des Giftes eine vollständige ist, wird man auch bei völlig übereinandergeschobenen Rollen des Apparates, zwar durch Stromschleifen vielleicht Zuckungen der Muskulatur in der Nähe der gereizten Stelle, aber nicht im Unterschenkel und Fuß erhalten können. Daß es sich hier bei völlig oder nahezu übereinandergeschobenen Rollen um Stromschleifen handelt, durch welche die Muskulatur direkt gereizt werden, läßt sich dadurch zeigen, daß die Muskelzuckungen nicht mehr auftreten, wenn man den Nerven möglichst weit nach oben (zentralwärts) freilegt und hier abschneidet. Wird nun das äußerste Nervenende bei der Reizung über die Elektrode gebrückt, so werden die früheren durch Stromschleifen hervorgerufenen Zuckungen ausbleiben. Während bei völliger Curarinlähmung die Muskulatur vom Nerven aus nicht erregbar ist, können Muskelzuckungen beim direkten Aufsetzen der Elektrode auf einen Beinmuskel in normaler Weise schon bei einem Rollenabstande von 8—15 *cm* der gebräuchlichen Induktionsapparate ausgelöst werden. Es ist charakteristisch für die Substanzen mit typischer Curarinwirkung, daß sie in Dosen, welche ausreichend sind, die Reizübertragung vom Nerven auf den Muskel zu blockieren, den Muskel selbst intakt lassen und diese Eigenschaft läßt sich zum biologischen Nachweis derartiger Produkte verwerten.

Bei Vorhandensein von genügend Untersuchungsmaterial kann zur weiteren Charakterisierung vorhandener Curarinwirkung ein bekannter Versuch von *Claude Bernard*[1]) dienen.

Man setzt einen normalen kleinen Wasserfrosch in eine Glasschale mit übergreifendem Deckel (Petrischale) und gibt dazu einen Wattebausch, der mit Äther getränkt ist. Nachdem der Frosch Rückenlage erträgt, wird er herausgenommen und wie oben beschrieben, unter Vermeidung von Blutungen aus den leicht verletzbaren Gefäßen, der Nervus ischiadicus in möglichster Ausdehnung präpariert. Unter diesem zieht man einen starken Baumwoll- oder Seidenfaden durch, schiebt zwischen Faden und Nerv einen dünnen, mit Ringerlösung getränkten Wattebausch (Fig. 29) und schnürt dann durch Anlegen eines Knotens den Oberschenkel unter dem Nerven fest ab. Die Ligatur muß so fest liegen, daß bei der Beobachtung der Schwimmhaut unter dem Mikroskop (s. S. 43) keine Zirkulation mehr wahrgenommen werden kann. Der Wattebausch wird dann über dem Nerven zu dessen Schutz vor Vertrocknung zusammengelegt und von Zeit zu Zeit mit Ringerlösung befeuchtet. Der Nerv darf von der Haut,

[1]) *Cl. Bernard*, Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses Paris 1857, p. 320. Nouveau tirage. Paris 1883, p. 320.

des schädlichen Sekretes wegen, nicht berührt werden. Nachdem sich der Frosch von der Narkose erholt hat, wird ihm die auf Curarinwirkung zu prüfende Lösung injiziert. Ist Curarinwirkung vorhanden, so ist Lähmung des Tieres nach $^1/_2$—1 Stunde eingetreten. Die Lösung hat sich überall im Körper des Frosches verbreitet, mit Ausnahme des umschnürten Beines, in welchem die Zirkulation ausgeschaltet wurde. Taucht man nunmehr den Fuß des nicht ligierten Beines in verdünnte Essigsäure, so zuckt, wenn die Curarinlähmung vollständig ist, nur das ligierte Bein, während in dem anderen vergifteten Beine Zuckungen ausgeschlossen sind. Der Versuch zeigt zugleich, daß die Empfindung des Frosches noch vorhanden ist, daß also die in der Haut liegenden sensibeln Nervenenden durch das Gift nicht gelähmt werden. Die Leitung erfolgt noch normal von der Haut zum Rückenmark und von hier zurück auf das abgebundene Bein. Dieser sogenannte Reflexbogen ist also für das abgebundene Bein intakt, welches natürlich auch reagiert, wenn es selbst durch Säure oder anderweitig gereizt wird.

Fig. 29.



Froschpräparation nach *Cl. Bernard.*

Das Vorhandensein schwächerer Grade von Curarinwirkung läßt sich noch durch den Versuch am isolierten Nervmuskelpräparat (s. d.) nachweisen.

Gesunde Frösche ertragen große Curarindosen und scheiden das Gift im Harn wieder aus. Mit dem Harn können von neuem andere Frösche vergiftet werden.

Nach der Untersuchung von *Tillie*[1]) hat an Wasserfröschen mittlerer Größe (etwa 50 *g*) **1/1000 *mg*** Curarin (*Boehm*) keine Wirkung. **1/100 *mg*** lähmt noch nicht vollständig, hingegen genügen **1·5/100—2/100 *mg*** zur Herbeiführung völliger Reflexlosigkeit im Verlauf von $^1/_2$—1 Stunde. Nach diesen Dosen erholen sich die in etwas Wasser gehaltenen Frösche nach 1—3 Tagen wieder. Nach größeren Dosen dauert die Erholung entsprechend länger.

Das Curarin ist eine quartäre Ammoniumverbindung. Führt man die tertiären Alkaloidbasen durch Methylierung in quartäre Verbindungen über, so bekommen sie fast alle mehr oder weniger stark ausgeprägte Curarinwirkung. Allerdings wird hierbei von keinem methylierten Alkaloid die Wirkungsstärke des Curarins erreicht. Zu den am stärksten wirksamen

[1]) *J. Tillie,* Über die Wirkungen des Curare und seiner Alkaloide. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 27. S. 1 (1890).

Produkten gehören methyliertes Strychnin und Atropin und diese sind etwa hundertmal weniger wirksam am Frosch als das Curarin.[1] Diese methylierten Produkte können toxikologische Bedeutung gewinnen, da sie neuerdings zum Teil in den Arzneischatz eingeführt wurden (z. B. Atropinmethylnitrat als Eumydrin und Apomorphinbrommethylat als Euporphin). Auch die aliphatischen quartären Ammoniumverbindungen, wie Tetramethylammoniumchlorid und synthetisches Muscarin haben Curarinwirkung.

Die erwähnten quartären Ammoniumverbindungen haben als Basen das Gemeinsame, daß sie sich mit Äther und Chloroform aus ihren Lösungen nicht ausschütteln lassen. Hierdurch kann eine Verwechslung mit tertiären Alkaloidbasen, welche Curarinwirkung besitzen, vermieden werden.

Von tertiären Basen mit Curarinwirkung ist am bemerkenswertesten das **Coniin**[2]), da bei ihm Lähmung zustande kommt ohne vorheriges Erregungsstadium. Die Curarinwirkung kann neben chemischen Reaktionen eventuell zur Charakterisierung des Coniins dienen. Allerdings tritt dieselbe erst bei größeren Mengen deutlich in Erscheinung.

Coniin, als salzsaures Salz *(Merck)* kleinen Wasserfröschen in den Brustlymphsack injiziert, hat folgende Wirkung:

1 *mg*. Bleibt ohne Wirkung.

5 *mg*. Nach $^1/_2$—1 Stunde wird das Tier schlaff und erträgt Rückenlage. Die Reflexe erlöschen aber bei dieser Dose nicht völlig und nach einigen Stunden ist das Tier wieder erholt.

10 *mg*. Nach 15 Minuten erträgt das Tier Rückenlage und ist bald völlig reflexlos. Der Herzschlag bleibt gut äußerlich sichtbar. Legt man 1—2 Stunden nach der Injektion den Nervus ischiadicus eines Beines frei, so erhält man keine Zuckung des Fußes bei elektrischer Reizung, während die Muskulatur direkt gut erregbar ist. Legt man den Frosch, bei welchem der Herzschlag äußerlich gut sichtbar bleibt, in etwas Wasser, so hat er sich bis zum nächsten Tage völlig erholt und auf Reizung des Nerven erfolgen die Zuckungen des Beines wieder in normaler Weise.

20 *mg*. Wirkt wie 10 *mg*. Hier ist nach mehreren Stunden der Herzschlag äußerlich kaum mehr sichtbar, trotzdem man das Herz bei Eröffnung des Thorax noch schlagend finden kann. Diese Menge kann als tödliche Grenzdose angesehen werden. Jedenfalls ist das Coniin für Frösche verhältnismäßig schädlicher als Curarin und Erholung erfolgt nach der mehrfachen Dose der peripher wirksamen Menge seltener.

Curarinwirkung besitzt dann von tertiären Alkaloiden noch das Cytisin[3]), dann vor allem das Strychnin (vgl. dessen Nachweis S. 44)

[1]) Über den Wirkungsgrad methylierter Alkaloide vgl. *H. Hildebrandt*, Zur Pharmakologie der Ammoniumbasen. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 53, S. 84 (1905).

[2]) Curarinwirkung besitzt das Coniin. hydrochlor. Merck. Es kommen aber nach *Boehm* [Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 15, S. 432 (1882)] und anderen Untersuchern auch Coniinsorten ohne ausgesprochene Curarinwirkung an Fröschen vor.

[3]) *R. Radziwillowicz*, Über Cytisin. *R. Koberts* Arbeiten a. d. pharmakol. Institut Dorpat. Bd. 2, S. 73 (1888).

und ausgeprägter das Brucin. Die beiden letztgenannten Alkaloide haben in großen Dosen namentlich für Wasserfrösche ausgesprochen peripher lähmende Wirkung, die beim Brucin ohne vorausgehendes Krampfstadium sich ausbildet. Bei Grasfröschen beobachtet man selbst bei großen Brucindosen tetanische Krämpfe vor dem Eintritt der Lähmung, während solche beim Curarin niemals auftreten.

8. Der Nachweis von Coffein und Theobromin.

Die Purinderivate lassen sich biologisch am Frosche durch eine eigentümliche Muskelwirkung charakterisieren, die namentlich am isolierten Muskel (s. d.) noch in großer Verdünnung nachzuweisen ist. Gibt irgend eine zu prüfende Substanz die chemischen Reaktionen der Purinderivate, so ist von vornherein die biologische Prüfung nicht am ganzen Frosche, sondern am Muskelpräparat anzustellen. Die Muskelwirkung ist auch am ganzen Tier zu beobachten und hier viel ausgeprägter an Grasfröschen als an Wasserfröschen. An Wasserfröschen treten aber nach *Schmiedeberg*[1] neben der Muskelwirkung noch tetanische Anfälle, wie nach Strychninvergiftung, auf, und diese Tatsache verlangt ein näheres Eingehen auf die Wirkung vor allem des Coffeins am ganzen Frosch, um einer etwaigen Verwechslung mit den früher erwähnten Krampfgiften vorzubeugen.

Injiziert man Wasserfröschen mittlerer Größe (bis zu 50 *g*) wässerige Lösungen reinen Coffeins subkutan in den Brustlymphsack, so beobachtet man folgendes:

1 *mg*. Diese Dose hat keine deutliche Einwirkung.

5 *mg*. Eine Stunde nach der Injektion zeigt der Frosch gesteigerte Reflexerregbarkeit und quakt bei leichter Berührung des Rückens. Der Thorax ist gebläht. Beim Springen werden die Zehen (Schwimmhäute) gespreizt. Die Wirkung dieser Menge geht nach einigen Stunden vorüber.

10 *mg*. (1 cm^3 einer $1^0/_0$igen Lösung). Bald nach der Injektion werden die Vorderbeine starr und nach innen verdreht gehalten. Später werden auch die Hinterbeine steif, so daß alle Bewegungen, namentlich das Umdrehen aus der Rückenlage sehr schwerfällig und steif geschehen. Der Thorax ist gebläht. Allmählich tritt Reflexsteigerung auf. Beim Sprung ist prononzierte Streckstellung der Hinterbeine auffällig, aber kein Tetanus. Die Steifheit geht nach mehreren Stunden vorüber und die Reflexsteigerung tritt stärker hervor. Beim Sprung werden die Beuger aber stärker innerviert als die Strecker, so daß Pikrotoxinstellung der Hinterbeine auftritt. Es dauert mehrere Tage, bis sich der Frosch von dieser Dose erholt hat.

[1] *O. Schmiedeberg*, Über die Verschiedenheit der Coffeinwirkung an Rana temporaria L. und Rana esculenta L. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 2. S. 62 (1874).

20 mg (2 cm^3 einer 1%igen Lösung). Bald nach der Injektion beginnt das Steifwerden der Vorder- und Hinterbeine. Die Vorderbeine werden gekreuzt, die Hinterbeine stark an den Körper angezogen. Nach einer Stunde ist die Steifheit der Beine geringer und Reflexsteigerung deutlich geworden. Bei Berührung des Körpers erfolgt reflektorisch Streckung der Hinterbeine. Auch tetanische Anfälle können auftreten, wie sie die Strychninwirkung charakterisieren. Nach dieser Dose erholen sich die Frösche meist nicht mehr.

An Grasfröschen tritt durch Coffein kein Tetanus auf, sondern nur die Muskelwirkung.

Theobromin ist nach *Filehne*[1]) für Frösche etwas giftiger als Coffein und ruft auch am Wasserfrosch keinen Tetanus hervor.

Zum Nachweis der Purinderivate sind in jedem Falle Grasfrösche zu verwenden, da sie die Muskelwirkung besser zeigen als Wasserfrösche.

9. Der Nachweis von Giften mit Digitalinwirkung.

„Eine Anzahl zum größten Teile stickstofffreier Pflanzenbestandteile, von denen die meisten zu den Glykosiden oder Pentosiden gehören, wirkt, abgesehen von quantitativen Unterschieden, in so gleichartiger Weise auf das Herz der verschiedensten Tierarten, daß jede dieser Substanzen in bezug auf den Charakter dieser Wirkung wie eine getreue Kopie der anderen erscheint. Sie werden schlechtweg als „Herzgifte" bezeichnet. Direkte Wirkungen auf das Nervensystem lassen sich mit Sicherheit weder an Menschen noch an Tieren nachweisen."

„Zu dieser Gruppe, die durch die praktisch wichtigen wirksamen Bestandteile der Digitalis purpurea, das Digitalin und Digitoxin, charakterisiert wird, gehören die nachstehend aufgeführten Stoffe"[2]): Digitalin, Digitoxin, Strophanthin, Antiarin, Oleandrin, Scillain, Adonidin, Helleborein, Convallamarin, Cheiranthin u. a. Als Beispiel der Wirkung dieser Produkte sei hier auf diejenige von **g-Strophanthin** eingegangen, welches als kristallinisches Produkt mit dem Vorzug konstanter Zusammensetzung den guter Wasserlöslichkeit verbindet und darum namentlich als Testsubstanz zu vergleichenden quantitativen Bestimmungen zu empfehlen ist.

Injiziert man mittelgroßen, in Zimmertemperatur gehaltenen Grasfröschen[3]) (30 *g*) von kristallisiertem Strophanthin (*Merck*) die stark wirksame Menge von **1/10 *mg*** in einem Kubikzentimeter Wasser gelöst in den Brustlymphsack, so tritt Herzstillstand nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde ein. An der Brustwand sind äußerlich keine Bewegungen des Herzens mehr

---

[1]) *W. Filehne*, Über einige Wirkungen des Xanthins, des Caffeins und mehrerer mit ihnen verwandter Körper. Archiv f. (Anat. u.) Physiol. 1886. S. 77.

[2]) *O. Schmiedeberg*, Grundriß der Pharmakologie. 6. Aufl. Leipzig 1909. S. 288.

[3]) Wegen ihrer größeren Empfindlichkeit gegenüber Substanzen mit Digitalinwirkung sind für Prüfungen am ganzen Tier Grasfrösche vorzuziehen.

wahrzunehmen und die Zirkulation in den Schwimmhäuten stockt. Nachdem der Herzstillstand eingetreten, wird der Frosch unruhig und springt und bewegt sich häufig. Aus der Rückenlage dreht er sich, trotz des eingetretenen Herzstillstandes, noch gut um und springt normal. Nach und nach wird die Atmung seltener und es macht sich allgemeine Erstickung bemerkbar. Die Pupillen werden eng und das noch normal sitzende Tier öffnet wiederholt weit das Maul. Allmählich, nach etwa einer Stunde, wird der Frosch schlaff und beginnt Rückenlage zu ertragen. Die Lähmung schreitet langsam weiter bis zur völligen Reflexlosigkeit.

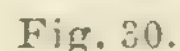
Etwa **1/100** ***mg*** ist die tödliche Grenzdose für mittelgroße Frösche. Es kann mehrere Stunden währen, bis durch diese Dose Herzstillstand sich ausbildet und daran anschließend Erstickung des Tieres zustande kommt.

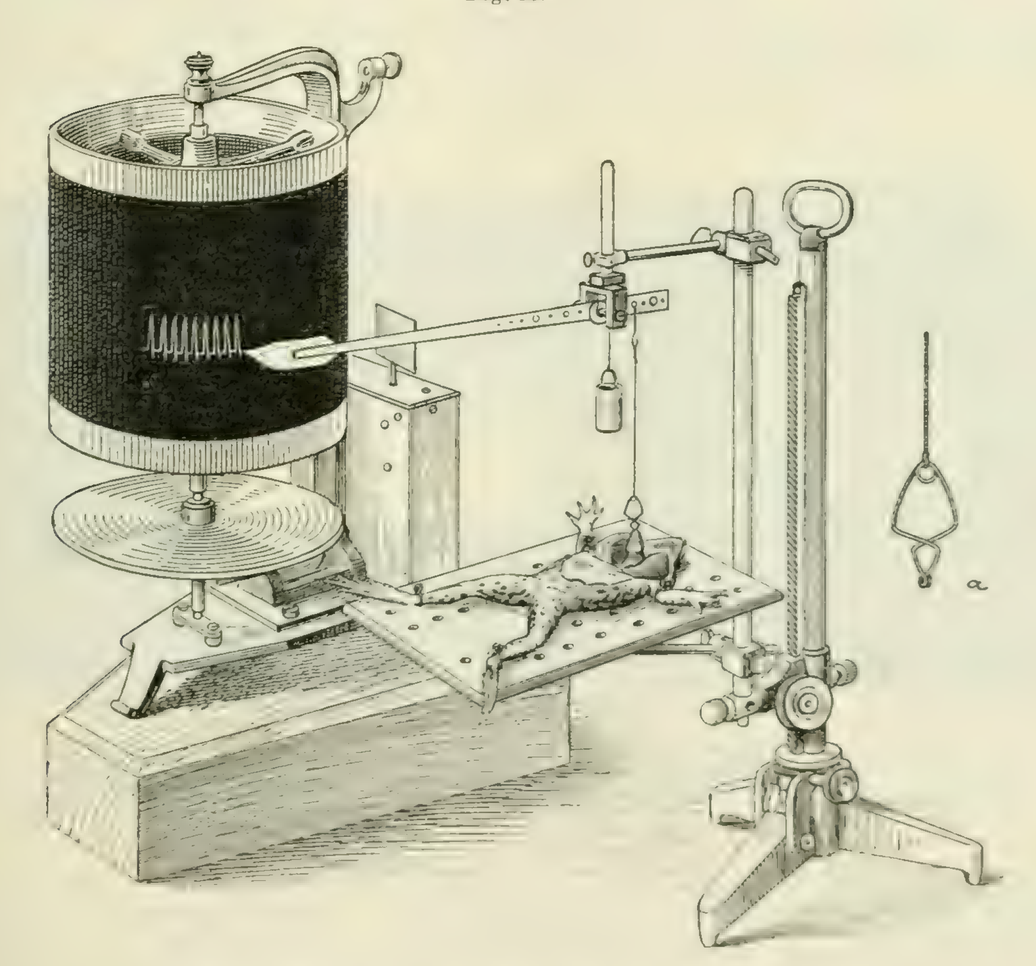
Öffnet man den Thorax des Frosches nach eingetretenem Herzstillstand, so findet man das Herz blutleer (blaß) und maximal kontrahiert. Es hat sich der für die Digitalissubstanzen charakteristische systolische Stillstand des Herzens ausgebildet.

Das Zustandekommen des systolischen Herzstillstandes läßt sich graphisch registrieren. Um eine gute Aufzeichnung der Herzbewegungen zu erhalten, muß der Frosch vollkommen unbeweglich sein. Zerstört man nur das Gehirn des Tieres, so ist dies nicht der Fall. Zerstört man aber auch das Rückenmark, so werden Herzschlag und Resorption sehr beeinträchtigt. Man wird darum den Frosch am besten narkotisieren. Zur Herbeiführung einer tiefen Narkose sind für mittelgroße Frösche 2 *cm*^{3} einer 10%igen Lösung von Urethan nötig, welche man den Tieren in den Brustlymphsack (ohne Verletzung der Brustmuskulatur: Blutungen vermeiden!) injiziert. Nach 5 bis 10 Minuten erträgt der Frosch Rückenlage, in welcher man ihn 1/2—1 Stunde lang vor Anstellung des Versuches beläßt. Die Reflexlosigkeit dauert 12—24 Stunden an.

Der Frosch wird, auf dem Teller mit dem Kopfe gegen den Operierenden liegend, in folgender Weise präpariert: Mit einer Hakenpinzette erfaßt man in der Mitte des Unterkiefers die glatte Haut und schneidet eine kleine Lücke in dieselbe ein. Durch diese wird das stumpfe Blatt der Schere eingeschoben, der Hautzipfel mit der Pinzette erfaßt und ein mittlerer Hautlappen bis in die Bauchgegend präpariert, der am besten nicht breiter als 2 *cm* ist. Jedenfalls muß man sich hüten, zu weit seitlich die Haut einzuschneiden, da hier Gefäße liegen, deren Verletzung starke Blutung zur Folge hat, und Blutungen müssen, um die Herztätigkeit intakt zu erhalten, möglichst vermieden werden. Nachdem der Hautlappen (Fig. 45 *d*) über den Bauch gelegt ist, wird mit der Pinzette der oberste knorpelige Teil des Brustbeins (*a*) erfaßt, genau in der Mitte gespalten und dieser Schnitt durch Eingehen mit dem stumpfen Scherenblatt, welches dicht unter dem Knochen (um einer Herzverletzung vorzubeugen) vorgeführt wird, durch die Mitte des knöchernen Brustbeinteiles (*b*) verlängert. Der sich an diesen weiter unten anschließende knorpelige

Teil *(c)* wird nicht median, sondern nach links herüber durchtrennt, um eine Verletzung der mittleren Bauchvene zu vermeiden. Bis an das Ende des knorpeligen Brustbeinteiles wird der Schnitt geführt und der Frosch jetzt auf dem gestielten Froschbrett mit Klammern (Fig. 30) befestigt. Das linke Hinterbein, in welches die zu prüfende Flüssigkeit injiziert wird, kann bei dem tief narkotisierten Tiere frei gelassen werden, zur bequemeren Vornahme der Injektion. Die Vorderbeine werden so befestigt, daß dabei der Thoraxschnitt weit klafft und das Herz freiliegt. Das Herz ist noch in dem Herzbeutel eingeschlossen, welcher mit feiner Pinzette am


Fig. 30.



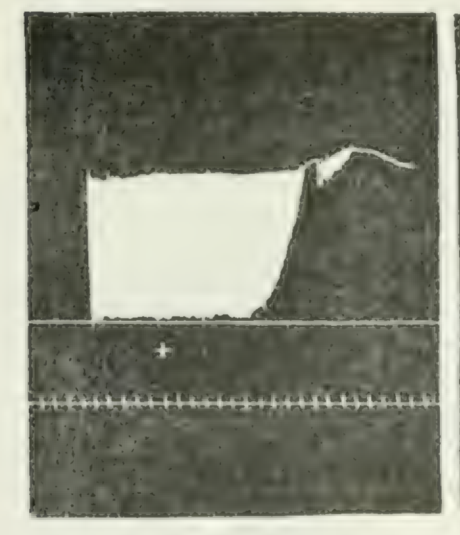
Graphische Registrierung der Herztätigkeit. *a* Herzklammer.

unteren Ende erfaßt und nach oben hin bis zur Teilung der Aorta eröffnet wird. Die Herzspitze wird mit einer feinen, aus Federdraht gebogenen Herzklammer (Fig. 30 *a*) erfaßt. An dieser ist mit einem Faden ein Haken befestigt, der in eines der Löcher am Schreibhebel eingehängt wird. Das Froschbrett wird in ein vertikal verstellbares Stativ eingespannt. Über demselben wird der durch Achsenbelastung in seinem längeren die Papierfahne tragenden Arme fast völlig entlastete Schreibhebel befestigt. Zum Einhängen des Hackens in den Schreibhebel wird das Froschbrett schräg gestellt. Nach dem Einhängen kann durch Drehen des Brettes,

nach der Horizontalen zu, der Schreibhebel richtig eingestellt werden. Vor dem Eintrocknen schützt man das Herz durch einen um dasselbe aufgebauten hohen Wall aus Watte, welche mit Ringerlösung getränkt ist. (In der Figur nicht gezeichnet.)

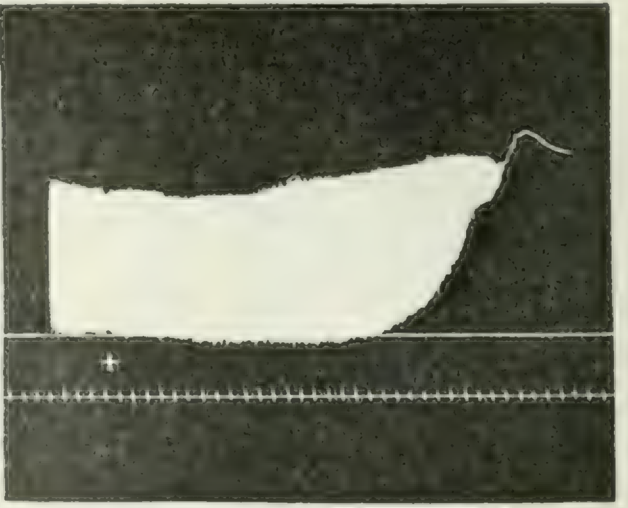
Die rhythmischen Bewegungen des Schreibhebels werden auf der berußten Papierfläche des Kymographions aufgezeichnet. Unter diese Kurve werden Zeitmarken geschrieben. Der Markiermagnet wird in einem zweiten Stative befestigt und am bequemsten entgegen der Trommelbewegung unter dem Herzhebel aufgestellt. (In der Figur nicht gezeichnet.) Man zeichnet eine Zeitlang die normale Herztätigkeit auf und injiziert dann dem Frosche die Giftlösung in den linken Oberschenkellymphsack. Hierzu sticht man an dem nicht fixierten Beine die mit feiner scharfer Nadel versehene gefüllte Injektionsspritze etwa 1 *cm* unterhalb des Knie-

Fig. 31.



Rana fusca. 55 *g*. Weiblich. Narkose. Herzfreilegung. Strophanth. cristall. 1 *mg* bei (+). Herzstillstand nach 14 Minuten.

Fig. 32.



Rana fusca. 45 *g*. Weiblich. Narkose. Herzfreilegung. Strophanth. cristall. $^1/_{10}$ *mg* bei (+). Herzstillstand nach 30 Minuten.

($^3/_4$ Größe der Originalkurven.)

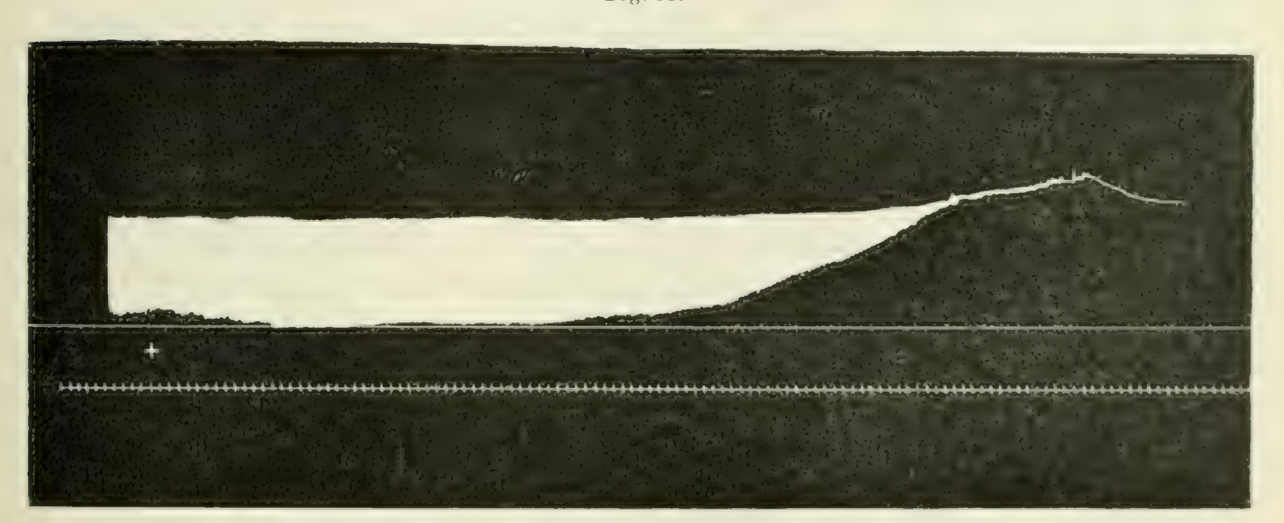
gelenkes in die Haut des Unterschenkels ein und führt von hier die Nadel unter Streckung des Beines vorsichtig unter der Haut vor bis unter die Oberschenkelhaut. Man injiziert und zieht die Nadel zurück; dann wird das Bein im Kniegelenk gebeugt. Diese Maßnahmen sollen einem Ausfließen der Injektionsflüssigkeit aus der Injektionsstelle vorbeugen. Ist die Injektion vorsichtig ausgeführt, so wird man (bei völlig reflexlosem Tier) in der Aufzeichnung des Schreibhebels keine Verschiebung oder Veränderung wahrnehmen.

Man bezeichnet den Moment der Injektion auf der berußten Fläche des Kymographions. Drei beigegebene Kurven, welche unter den oben geschilderten Bedingungen aufgenommen wurden, zeigen die Wirkung von verschieden großen Dosen Strophanthin. cristall. *Merck* (1 *mg*, $^1/_{10}$ *mg*, $^1/_{100}$ *mg*), das drei narkotisierten Grasfröschen in den Oberschenkellymphsack injiziert wurde. Kurve Fig. 31 und 32 wurden in $^3/_4$ Größe des

Originals, Kurve Fig. 33 in halber Originalgröße wiedergegeben. Da bei Aufzeichnung der Giftwirkung hier nicht die Form der Einzelkurve der Herzpulse, sondern das Gesamtbild der Kurvenschar von Interesse ist, so wurde nach dem Vorgange von *W. Straub*[1]) bei so langsamem Trommelgange registriert, daß vom Schreibhebel auf dem berußten Papier nur eine einzige ununterbrochene Silhouette ausgewischt wurde. Wie beim isolierten Herzen ist auch hier der Anstieg der „Silhouettenkurve" bis zum endgültigen systolischen Stillstand des Herzens um so steiler, je rascher die Vergiftung verläuft. Bei Aufnahme der ersten und zugleich steilsten Kurve trat der Stillstand nach 14 Minuten, bei der zweiten nach 30 und bei der dritten nach 105 Minuten ein.

Obgleich diese Kurven an sich das Vorhandensein einer Substanz mit Digitalinwirkung in der Injektionsflüssigkeit hinreichend klar beweisen, so kann man doch zur weiteren Charakterisierung des vorhandenen Still-

Fig. 33.



Rana fusca. 50 *g*. Weiblich. Urethannarkose (2 cm^3 10% Sol.). Herzfreilegung. Strophanthin. cristall. 1/100 *mg* bei (+) im Oberschenkellymphsack. Herzstillstand nach 150 Minuten. Zeit in Minuten. (Halbe Größe der Originalkurve.)

standes noch einen Tropfen einer 1/2%igen Atropinlösung auf das stillstehende Herz auftropfen. Tritt hier nicht bald wieder regelmäßige Herztätigkeit ein, so ist die in der injizierten Lösung vorhandene, den Herzstillstand herbeiführende Substanz jedenfalls kein Muscarin. Obgleich Muscarin keinen systolischen, sondern diastolischen Stillstand des Herzens am Frosche hervorruft, so kann unter Umständen bei der graphischen Registrierung der Tätigkeit des Herzens am ganzen Frosche doch systolischer Stillstand, wenigstens solcher in halber Höhe der systolischen Kontraktion, vorgetäuscht werden. Auch ist nach dem Stillstand des Herzens dieses auf seinen Kontraktionszustand zu untersuchen. Tritt der Herzstillstand innerhalb 1—2 Stunden ein, so ist das Herz des Grasfrosches immer

[1]) *W. Straub*, Quantitative Untersuchungen über den Chemismus der Strophanthinwirkung. Biochem. Zeitschr. Bd. 28. S. 392 (1910).

stark kontrahiert und blutleer. Kommt aber der Stillstand des Herzens erst sehr spät zustande, nach 12—24 Stunden, so ist derselbe kein rein systolischer mehr, sondern er ist ein mehr oder weniger diastolischer.

Zu bemerken ist, daß für den qualitativen Nachweis der Digitalissubstanzen der Versuch am ganzen Frosch, namentlich unter Injektion in den Oberschenkellymphsack wichtiger ist, als der allerdings empfindlichere Versuch am isolierten Herzen (s. d.). An isolierten Herzen sind die Substanzen mit Digitalinwirkung von den ihnen nahestehenden Saponinen nicht einfach zu unterscheiden, da auch diese Produkte am isolierten Organe systolischen Stillstand hervorrufen. Hingegen ist dies nicht der Fall bei Injektion in den Oberschenkellymphsack, aus welchem sie nicht genügend resorbiert werden, um Herzstillstand herbeizuführen. Sie bringen hier nur lokal die Muskulatur in der Nähe der Injektionsstelle zum Absterben.[1])

10. Die Wertbestimmung von Digitalisblättern und -präparaten.

Als wirksame Glykoside sind nach *Schmiedeberg*[2]) in den Digitalisblättern Digitoxin, Digitalin und Digitalein enthalten, unter welchen dem Digitoxin die stärkste Wirkung zukommt. Das Digitoxin ist in reiner Form[3]) in Wasser nur spurenweise löslich. Es findet sich aber in der Pflanze in löslicher Form, und zwar nach *R. Gottlieb*[4]) als Glykotannoid, als Verbindung mit Gerbsäure, welche in reinem Wasser zwar auch wenig, aber in verdünnten Alkalien leicht löslich ist.

Der Gehalt der Blätter an den drei wirksamen Bestandteilen ist ein mit dem Standort der Pflanze und dem Jahrgang derselben wechselnder. Um dem verordnenden Arzte ein immer gleichwirksames Arzneimittel zu liefern, werden die Digitalisblätter, wie auch die daraus hergestellten Präparate neuerdings auf einen bestimmten Wirkungswert eingestellt und dies geschieht ausschließlich auf biologischem Wege durch Dosierung am Frosche.

Zur Wertbestimmung der Digitalisblätter und -präparate sind bereits zahlreiche Methoden ausgearbeitet worden. Hier soll in erster Linie das am eingehendsten geprüfte Verfahren von *Focke*[5]) besprochen werden.

---

[1]) *R. Kobert,* Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904. S. 16.

[2]) *O. Schmiedeberg,* Untersuchungen über die pharmakologisch wirksamen Bestandteile der Digitalis purpurea L. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 3. S. 16 (1875).

[3]) *H. Kiliani,* Über β-Digitoxin. Archiv d. Pharmazie. Bd. 233. S. 315 (1895). — Derselbe, Über Digitoxin. Ibid. Bd. 234. 483 (1896).

[4]) *R. Gottlieb* und *R. Tambach,* Über Digipuratum. Münchener med. Wochenschr. Jahrg. 58. S. 10 (1911).

[5]) *C. Focke,* Die physiologische Wertbestimmung der Digitalisblätter. Archiv d. Pharmazie. Bd. 241. S. 128 und 669 (1903). — Derselbe, Weiteres zur physiologischen Prüfung der Digitalisblätter. Ibid. Bd. 245. S. 646 (1907). — Derselbe, Der jetzige Stand der physiologischen Digitalisprüfung, ihr Wert für die Praxis und für die Forschung. Ibid. Bd. 247. S. 544 (1909). — Derselbe, Die kurzzeitige Injektionsmethode der physiologischen Digitalis- und Strophanthusprüfung. Ibid. Bd. 248. S. 345 (1910).

welches sich an ein durch *Hans Meyer* angeregtes Verfahren von *Ziegenbein*[1]) anschließt.

Das Prinzip der Methode von *Focke* ist folgendes: Von einem wässerigen Auszug der Digitalisblätter wird einem Grasfrosche, dessen Herz freigelegt ist, eine bestimmte Menge injiziert und es wird beobachtet, in welcher Zeit Herzstillstand eintritt. Injiziert man Grasfröschen von 20—30 *g* von einem 10⁰/₀igen Infuse den vierzigsten Teil ihres Gewichtes in zwei Hälften verteilt in die Oberschenkellymphsäcke, so soll der Herzstillstand durchschnittlich, bei Anstellung von mindestens vier Versuchen, zwischen 9 und 11 Minuten eintreten.

Blätter, welche dieser Forderung entsprechen, haben nach *Focke* einen „Valor" von 4·0—4·5. Dieser Wert wird berechnet aus der Gleichung: $V = \frac{p}{d \cdot t}$, worin p das Gewicht des Frosches, d die injizierte Dose und *t* die Zeit bezeichnet, welche von der Injektion des Tieres bis zum Herzstillstand vergeht. Hat man z. B. einen Frosch von 24 *g* Gewicht, so erhält er 0·6 *cm*³ des 10⁰/₀igen Infuses. Vergehen 10 Minuten bis zum Stillstand, so ergibt sich der Wert 4·0. Dieser Wert der Blätter kann auch in schlechten Jahren erhalten und darum als Normalwert[2]) angenommen werden. Auf ihn wird die Droge in Jahren mit stärker wirkender Ernte eingestellt.

Ausführung der Prüfung. Zu der Prüfung eignen sich am besten möglichst gleichgroße Grasfrösche im Gewichte von 20—35 *g*. Im Sommer sollen dieselben frisch gefangen, aber immerhin einige Tage in Gefangenschaft vor Anstellung der Versuche gehalten sein. Für den Winter werden die Tiere im September gefangen und in nicht zu kaltem Raume (Keller) aufbewahrt. Von Mai bis Oktober sind beide Geschlechter gleich brauchbar. Von November an nur männliche Tiere.

Die Tiere werden aus dem kühlen Raume 2—3 Tage vor Anstellung der Versuche in Töpfen oder Gläsern in den Untersuchungsraum gestellt, dessen Temperatur auf 18—20⁰ (auch im Sommer nicht höher!) gehalten wird.

Zur Prüfung ist ein Blechkasten nötig, welcher eine Grundfläche von 28:55 *cm* und 12 *cm* Höhe hat. An einer Seitenwand ist oben und unten je eine mit Kork verschließbare Öffnung angebracht. Die erste ist zum Eingießen von heißem Wasser bestimmt, die untere dient zum Ablassen desselben. Zur eventuellen Abkühlung kann durch den Scharnierdeckel des Kastens Eis eingebracht werden. Auf diesen Kasten werden die dünnen und etwa 10:27 *cm* messenden Froschbretter gelegt nebst dem halb so breiten, sonst aber ganz gleichartigen Thermometerbrett. Auf letzterem ist dauernd ein gutes Thermometer so befestigt, daß der Queck-

[1]) *H. Ziegenbein*, Wertbestimmung der Digitalisblätter. Archiv d. Pharmazie. Bd. **240**. S. 454 (1902).

[2]) Vgl. „Fol. Digital. titrat." der Firma *Caesar & Loretz*, Halle a. S.

silberbehälter dem Holz flach aufliegt; zum Abschluß gegen die Außenluft ist das untere Thermometerende von einem, mit Heftzwecken befestigten hellen Flanellappen bedeckt. Diejenigen Untersuchungsbrettchen, die gerade zum Versuch dienen, müssen vorher ebenso trocken sein wie das Thermometerbrett.

Durch Erwärmen der Frösche ist es in der kalten Jahreszeit immer möglich, die Empfindlichkeit derselben so weit zu erhöhen, daß sie in normaler Weise reagieren. Abkühlung in der heißen Jahreszeit erweist sich seltener als nötig.

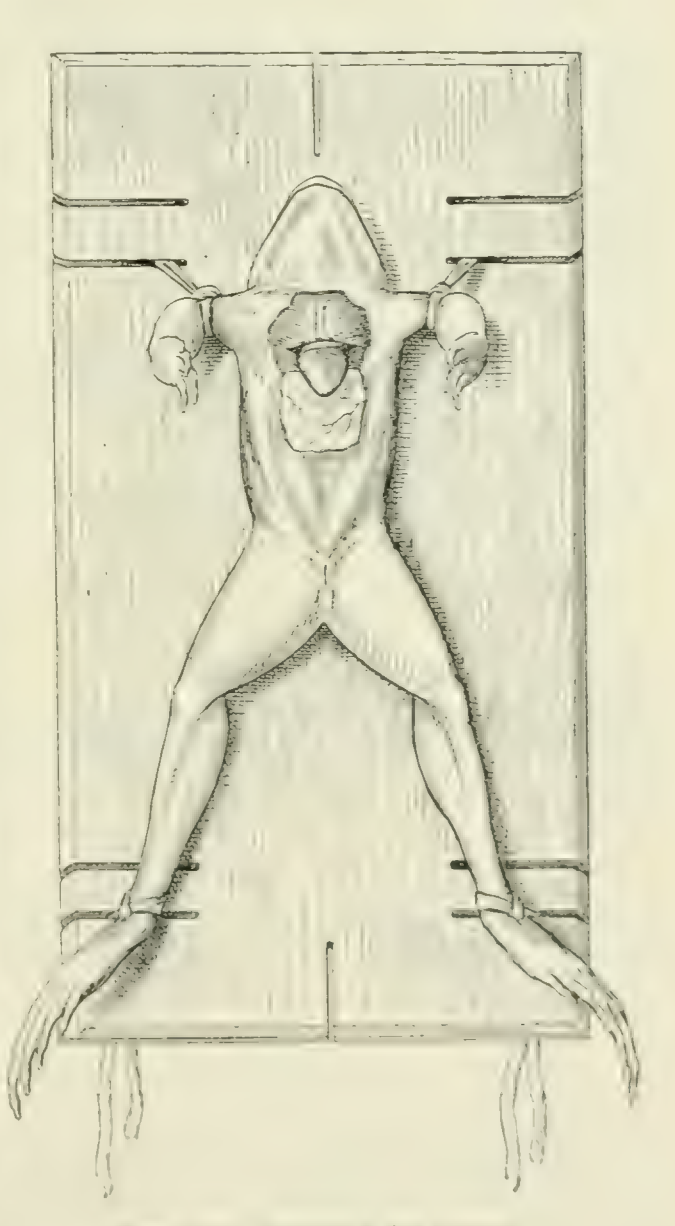
Soll eine Wertbestimmung von Digitalisblättern vorgenommen werden, so vergleicht man die zu untersuchende Probe am besten mit den „Fol. Digital. titrat." des Handels, die einen Valor von 4·0 besitzen. Unter Verwendung dieses Testpräparates prüft man zunächst die Reaktionsfähigkeit der Frösche. Man muß an den Tieren bestimmen, ob die Normalprobe den angegebenen Normalwert besitzt. Ist dies der Fall, so kann die zu prüfende Blätterprobe in gleicher Weise untersucht werden. Ergibt die Normalprobe zu hohe oder zu niedere Werte, so muß entsprechend abgekühlt oder erwärmt werden. Die Feststellung der Normalwerte wird erleichtert durch die Beobachtung der Pulsfrequenz der Tiere. Etwa 40—60 Pulsschläge pro Minute sind das Richtige. Bei 30 bis 40 Schlägen ist es erheblich zu kühl; bei höherer Frequenz als 60 ist es zu warm. Bei einiger Übung reichen 4—5 Frösche aus zur Feststellung der richtigen Temperatur. So lange dann die gleiche Witterung andauert, braucht man nur jeden Tag dasselbe Temperaturoptimum im Zimmer herstellen und wird dann gleichmäßige Resultate erhalten können. Sobald sich aber die Witterung ändert, muß zur Vermeidung von Fehlern an der Normalprobe aufs neue das Temperaturoptimum bestimmt werden. Damit stehen die Wertprüfungen immer auf festem Boden.

Hat sich bei der Vorprobe mit dem Testpräparat eine Temperaturregulierung durch den Kasten als notwendig erwiesen, so wird dieser eine halbe Stunde vor der Untersuchung auf die gewünschte Temperatur gebracht. Auf ihm befinden sich dann neben dem Thermometerbrett schon vier leere Froschbretter und das Glas mit der Injektionsflüssigkeit.

Der Frosch wird an den Beinen mit vier Schlingen aus dicken Baumwollfäden versehen, welche dann durch Einschnitte des Froschbrettes gezogen werden (Fig. 10 und Fig. 34. Hier ist ein kleineres Froschbrett, als im Texte angegeben, aufgezeichnet). Zwischen den Armen beginnend, schneidet man einen kleinen Hautlappen nach unten hin ab (Fig. 34), erfaßt dann von der Seite her den unteren knorpeligen Teil des Brustbeins (Fig. 45 c) mit der Pinzette, geht mit stumpfem Scherenblatt hier ein und schneidet dann nach oben hin eine kleine viereckige Öffnung. Man erblickt das pulsierende Herz nur zum kleinen Teil. Namentlich der Herzventrikel liegt tiefer unten. Man schneidet nunmehr den feinen Herzbeutel der Länge nach auf und drückt dann leicht auf den Unterleib in der Ventrikelgegend. Der Ventrikel wird dadurch herausgepreßt und liegt nun frei, wie in

Fig. 34 dargestellt. Die Lücke darf nur so groß sein, daß gerade der Ventrikel herausgedrückt werden kann. Ist die Öffnung größer, so wird leicht bei Bewegungen des Tieres die Leber herausgedrängt, was vermieden werden muß. In der angegebenen Weise werden zunächst zwei Frösche präpariert. Da man zur Bemessung der Dosis das Froschgewicht kennen muß, so wird das Froschbrett samt dem Tier gewogen und das vorher bekannte Gewicht des Brettes abgezogen. Das Froschgewicht wird notiert. Nach dem Wiegen wird das Brett mit dem Tier sofort wieder auf den Kasten gelegt, damit es im ganzen etwa $^1/_4$ Stunde lang von unten diejenige Temperatur erhält, die das Brettchenthermometer zeigt. Dabei wird das Herz nach Rhythmus und Schlagzahl beobachtet. Ein Tier, welches (z. B. im Februar, März) ein schlaff degeneriertes, auch nach einigem Warten allzu träge arbeitendes Herz besitzt, wird durch ein neues ersetzt. Wenn aber die Herztätigkeit, wie doch meistens der Fall, gut ist, so erhalten die beiden ersten Tiere ihre Injektion. Die Spritze wird mit der zu untersuchenden Lösung einmal durchgespritzt; dann wird das bestimmte Quantum so verteilt, daß der eine Oberschenkel rasch ungefähr die Hälfte, der andere den Rest erhält. Hierzu wird die möglichst fein zugeschliffene Spitze der dünnen Nadel der Injektionsspritze etwas unterhalb des Knies in den Unterschenkellymphsack eingestochen und von da aus vorsichtig, dicht unter der Haut, nach dem Oberschenkellymphsack vorgeführt bis etwa in seine Mitte. Die Injektion darf nicht in die Muskulatur, sondern nur in den Lymphsack vorgenommen werden. Bei Verwendung einer feinen Nadel und Einführung vom Unterschenkellymphsack aus ist ein Ausfließen der Flüssigkeit aus der Einstichstelle so gut wie ausgeschlossen. Nach der Injektion wird die Nadel rasch zurückgezogen und sofort auf der daneben

Fig. 34.



Rana fusca. Freilegung des Herzens.

liegenden Uhr die Zeit der Injektion festgestellt. *Focke* empfiehlt, dann aus einer kleinen, in einem Glase Wasser stehenden Pipette, je einen Tropfen auf die Kehle, das Herz und den Oberschenkel des Tieres zu träufeln und jeden Oberschenkel sogleich zwischen zwei Fingerkuppen einige Male sanft nach der Leistengegend hin zu massieren. Nunmehr kommt das Brett mit dem Frosche wieder an seinen Platz und die Injektionszeit wird notiert. Während man auf die Wirkung bei den ersten Tieren wartet, präpariert man die beiden folgenden. Sobald bei einem Tiere der Kammerstillstand eingetreten und notiert ist, wird wieder ein trockenes Brettchen auf den Kasten gelegt, das Tier aber durch Zerstörung von Gehirn und Rückenmark getötet und zur eventellen Berichtigung des ersten Gewichtes ohne das Froschbrett gewogen. (Dabei wird natürlich die injizierte Dosis mitgewogen und abgezogen. Die aufgeträufelten Wassertropfen bleiben außer Betracht: mindestens ebensoviel Flüssigkeit hat das Brettchen aufgenommen.)

Nr.	Datum	Temperatur im Zimmer (ev. auch Keller- und Außenluft)	Temperatur des Brettchens	Rana fusca. Quelle und Datum des Bezuges	Rana fusca. Geschlecht	Rana fusca. Gewicht p	Präparat	Injizierte Flüssigkeitsmenge relativ zum Froschgewicht	Dosis d

Injektion Uhr	Cor	Stillstand Uhr	also Zeit t	Durchschnitt	Valor $\left(=\frac{p}{d\,.\,t}\right)$ v	V	Bemerkungen

Ein übersichtliches Protokoll ist durchaus nötig. *Focke* verwendet das vorstehende Formular. In die Kolumne „Cor" trägt man die Schlagzahlen kurz vor der Injektion ein, auch nach Belieben z. B. den Beginn der „Herzperistaltik". Die übrigen Reihen verstehen sich nach dem bisher Gesagten von selbst.

Die zu prüfenden Lösungen werden nach *Focke* in folgender Weise hergestellt:

a) Das Blätterinfus. Wenn man nicht sicher weiß, daß das Blätterpulver scharf getrocknet war, so wird es zuerst bei 60—80° mäßig ausgebreitet eine halbe Stunde lang nachgetrocknet. Darauf gibt man 2 *g* in

einen kleinen Porzellansalbentopf, der in ein größeres Gefäß gestellt wird. In letzteres wird soviel kochendes Wasser gegossen, daß es bis zur halben Höhe des Porzellantöpfchens reicht. Dann werden in einem weiten Reagenzglase knapp 24 *cm*³ Wasser mit einem Zusatz von 8 Tropfen einer 5%igen wässerigen Sodalösung gekocht und dieses schwach alkalische Wasser kochend auf das Pulver geschüttet. Man rührt mit einem Glasstabe schnell einige Male um, so daß alle Klümpchen verschwinden, legt den Deckel fest auf und läßt 20 Minuten ziehen. Nunmehr wird durch ein Läppchen von altem feinen Taschentuchleinen in ein Reagenzrohr filtriert, wobei das Läppchen möglichst kräftig ausgepreßt wird. Man erhält fast 20 *cm*³ Filtrat; bis zu diesem Quantum, welches am Reagenzglase markiert ist, wird mit Wasser durch eine Pipette nachgefüllt, so daß stets ein 10%iges Infus entsteht. Das Filtrat ist immer trübe; das stört die Untersuchung nicht. Sollte die Trübung einmal gar zu erheblich aussehen, so darf das fertige Infus noch durch ein zweites Läppchen gepreßt werden; aber dann wird natürlich nicht noch einmal bis zu 20 *cm*³ ergänzt. Keinesfalls darf durch Papier nachfiltriert werden, da ein wechselnder Teil der wirksamen Substanzen durch dasselbe zurückgehalten wird. Das Infus wird vor Sonnenlicht geschützt gehalten und spätestens einige Stunden nach der Herstellung untersucht. Wenn die ersten zwei Versuche ergeben, daß die Probe ausnahmsweise vermutlich einen Wert unter 3·5 hat, so werden 15 *cm*³ des Infuses in einem Schälchen, welches in einem schwach kochenden Wasserbade steht, unter großer Vorsicht auf 10 *cm*³ eingedunstet. Die von diesem 15%igen Infuse gegebenen Dosen werden dann auf die des 10%igen umgerechnet. Bei diesem schwachen Eindunsten geht, nach *Fockes* Kontrollversuchen, nichts von der Wirkung verloren. Bei Proben mit einem Wert unter 2·5, welche aber bei Blättern frischer Ernte kaum vorkommen, wird ein 20%iges Infus neu hergestellt.

b) Tinct. Digitalis und andere alkoholhaltige Digitalispräparate. Hier wird der Alkohol durch vorsichtiges Einengen auf dem Wasserbade zum größten Teile entfernt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Bei Tinct. Strophanthi ist ein Entfernen des Alkohols nicht nötig; an dessen Stelle tritt die Wasserverdünnung, auf deren Grad viel ankommt. Wenn man mit der normalen Tinct. Strophanthi (*Kombé*) den Valor 100 erzielen will, wie ihn durchschnittlich diese Tinktur besitzt, so verdünnt man 1 *cm*³ mit 19 *cm*³ Wasser. Der Grad der Verdünnung ist in diesem Falle nach *Focke* von beträchtlichem Einfluß auf das Resultat.

c) Trockene Präparate der Digitalisgruppe werden zu ihrer Prüfung zuerst in demjenigen Stärkeverhältnis wässerig gelöst, das vermutlich ihrem Vorhandensein im 10%igen Aufguß der Mutterdroge entspricht; bei der Prüfung wird die Lösung nach Bedarf konzentrierter genommen. Ist das Pulver nur (oder fast nur) alkohollöslich, so wird zuerst eine starke alkoholische Lösung hergestellt, dann diese allmählich unter langsamem Rühren, damit das Gelöste nicht ausfällt, mit Wasser bis zur gewünschten Verdünnung gemischt. Mehr als 10% Alkohol sollte darin nicht verbleiben

Neben der beschriebenen, von *Focke* sehr genau ausgearbeiteten Methode, welche bei genügender Vertrautheit mit derselben sicher brauchbare Werte bei der Prüfung der Digitalisprodukte ergibt, existieren noch andere Prüfungsmethoden am Frosche, von denen einige hier kurz beschrieben seien. Eine Zusammenstellung und Kritik derselben findet sich bei *Ch. W. Edmunds* and *Worth Hale*[1]) und bei *Focke*.[2])

Während bei *Focke* den Hauptfaktor für die Wertbestimmung der Digitalispräparate die Zeit darstellt, welche von der Injektion bis zum Herzstillstand vergeht, bestimmt *Gottlieb*[3]) die kleinste Menge, welche innerhalb 30 bis höchstens 45 Minuten den Stillstand in der Mehrzahl der Fälle bei Verwendung gleichgroßer Grasfrösche (von etwa 30 *g*) herbeiführt. Man kann diese kleinste Dose als „Einheit" bezeichnen und die Wertigkeit nach der Zahl solcher Einheiten pro Gramm Präparat ausdrücken. Das frisch bereitete Infus eines gut wirksamen Digitalispulvers muß demnach mindestens 40—50 Einheiten auf 1 *g* der angewandten Blätter enthalten. Bei den stärksten Blättersorten entspricht das frisch bereitete Infus von 1 *g* aber mitunter bis 120 Einheiten.

Abweichend hiervon bestimmt *E. M. Houghton*[4]) am Frosche die minimal tödliche Dose der Digitalispräparate, d. h. die Menge, welche im Verlaufe von 12 Stunden bei Injektion in den Brustlymphsack des nicht operierten Frosches den Tod des Tieres herbeiführt. Die Ausführung erfolgt in der Weise, daß von zwei Gruppen von Fröschen, welche alle möglichst dasselbe Gewicht haben, die eine mit einer Testlösung, die andere mit der zu prüfenden Lösung in gleichen Konzentrationen injiziert wird. Die Dosen bilden eine Reihe von geringerer bis zu größerer Stärke, aber bei der einen Froschgruppe genau ebenso wie bei der anderen. Nach 12 Stunden wird bei jeder Gruppe die Zahl der Toten notiert. Zu jeder Prüfung ist natürlich eine mehrfache Wiederholung mit enger werdenden Dosengrenzen erforderlich, so daß gewöhnlich vier Tage für eine Prüfung nötig sind. Allerdings können mehrere Proben gleichzeitig untersucht werden. Diese Methode ist von allen sicher die einfachste und bequemste, hat aber den Nachteil, daß man zu ihrer Ausführung viel mehr Frösche braucht, als bei den erstgenannten.

Die Wertbestimmung der Digitalisprodukte unter Verwendung des isolierten Froschherzens, welche *Schmiedeberg*[5]) der Prüfung am

[1]) *Ch. W. Edmunds* and *W. Hale*, The physiological Standartization of Digitalis. Washington. Hygienic Laboratory. Bulletin Nr. 48. December 1908.

[2]) *C. Focke*, Betrachtung der neuen in- und ausländischen Arbeiten über die Digitalisprüfung. Arch. d. Pharmazie. Bd. 248. S. 365 (1910).

[3]) *R. Gottlieb*, Über die physiologische Wertbestimmung von Arzneimitteln. Münchener med. Wochenschr., 1908. Nr. 24. — *R. Gottlieb* und *R. Tambach*, Über Digipuratum. Ibid. 1911. Nr. 1. S. 11.

[4]) *E. M. Houghton* zitiert nach *Focke*, l. c.

[5]) *O. Schmiedeberg*, Untersuchungen über die Bestimmung des pharmakologischen Wirkungswertes der getrockneten Blätter von Digitalis purpurea. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 62. S. 305 (1910).

ganzen Frosche vorzieht und von welcher *Straub*[1]) vermutet, daß sie leistungsfähiger sein wird, namentlich zur Bestimmung absoluter Werte. ist auf ihre Brauchbarkeit bisher noch nicht genügend untersucht worden.

11. Der Nachweis von Aconitin.

Von den verschiedenen in Aconitum- und Delphiniumarten sich findenden Alkaloiden besitzt namentlich das Aconitin aus Aconitum Napellus toxikologische Bedeutung. In dieser Pflanze ist neben einem kristallinischen ein amorphes „Aconitin" enthalten. Ersteres ist giftiger und für den toxikologischen Nachweis wichtiger als das amorphe Produkt. das aber dieselbe charakteristische Wirkung wie das kristallinische Produkt aufweist.

Wie für den Menschen und die höheren Wirbeltiere ist auch für den Frosch das Aconitin außerordentlich giftig, was für den toxikologischen Nachweis des Produktes von Bedeutung ist, da sich bei Vergiftungen meist nur kleine Mengen wirksamer Substanz finden.

Selbst Mengen von **1/1000 *mg*** des salzsauren kristallinischen Aconitins *(Merck)* sind am Frosche nicht unwirksam. Injiziert man kleinen Wasserfröschen (30 *g*) diese Menge in den Brustlymphsack, so treten im Verlauf der nächsten Stunden Lähmungserscheinungen auf, welche etwa zwei Tage anhalten und durch leichte Ermüdbarkeit des Frosches gekennzeichnet sind. Das vergiftete Tier dreht sich mehrere Male gut aus der Rückenlage um, erschlafft dann aber völlig und erträgt längere Zeit Rückenlage.

1/100 *mg* hat schon die charakteristische und für den toxikologischen Nachweis verwertbare Herzwirkung. Bei einiger Übung läßt sich diese Wirkung am unverletzten Frosche durch die Brustwand hindurch erkennen. Es ist aber vorzuziehen, das Herz in der beim Nachweis von Substanzen mit Digitalinwirkung angegebenen Weise freizulegen, um die Erscheinung, die hier erst deutlich verfolgt werden kann, zu beobachten oder besser gleich graphisch zu registrieren. Man kann, am besten wieder am narkotisierten Frosche, hier genau dieselben Kurven erhalten, wie sie beim Versuche am isolierten Herzen (s. d.) wiedergegeben sind.

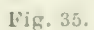
Boehm[2]) unterscheidet als Aconitinwirkung folgende drei am freigelegten Herzen zu beobachtende Stadien: 1. ein Stadium der Beschleunigung der Herzschläge; 2. ein Stadium der Herzkrämpfe; 3. ein Stadium des Herzstillstandes. Von diesen drei Stadien ist dasjenige der „Herzkrämpfe", die heute meist als „Herzperistaltik" bezeichnet werden, dem Aconitin besonders eigentümlich und für den Nachweis verwertbar. Die Erscheinung beginnt an den Vorhöfen und geht dann auf den Ventrikel über. Auf dem Höhepunkt der Peristaltik entleert das Herz seinen

[1]) *W. Straub*, Quantitative Untersuchungen über den Chemismus der Strophanthinwirkung. Biochem. Zeitschr. Bd. 28. S. 407 (1910).

[2]) *R. Boehm*, Studien über Herzgifte. Würzburg 1871. S. 26

Inhalt so gut wie gar nicht, sondern derselbe wird unter wurmförmigen Bewegungen der Herzwand im Herzen hin und her geschoben. Der Ventrikel bekommt hierbei ein eigentümlich fleckiges Aussehen: Dunkle vorgewölbte Stellen wechseln mit hellen kontrahierten ab, so daß ein Bild entsteht, das festzuhalten in Fig. 35 versucht worden ist. *Kobert* [1]) spricht nicht unpassend von einer „Maulbeerform" des Herzens. Je nach der Aconitindose und dem Zustande der Frösche geht diese Erscheinung rascher oder langsamer wieder in eine regelmäßige Herztätigkeit über, welche aber bedeutend verlangsamt ist und bei welcher der Vorhof viel häufiger als der Ventrikel pulsiert. Auf das Stadium der langsamen Pulse folgt, wenigstens bei größeren Dosen als $^1/_{100}$ *mg*, Stillstand des Herzens in Diastole.

Bei dieser Dose von $^1/_{100}$ *mg* salzsaurem kristallinischen Aconitin beobachtet man an den Fröschen, namentlich in der Nähe der Injektionsstelle, ausgeprägte fibrilläre Zuckungen, wie nach Guanidininjektion. Die Erscheinung geht in etwa einer Stunde vorüber. Nach dieser Zeit erträgt der Frosch dauernd Rückenlage und wird schließlich völlig reflexlos. Hält man das Tier in etwas Wasser, so erholt es sich von der curarinartigen Lähmung in einigen Tagen wieder.


Fig. 35.


Aconitinwirkung am Herzen.

1/10 *mg*. Hier ist der Verlauf der Vergiftung ein rascherer. Die Peristaltik dauert meist nur kurze Zeit an und nach etwa einer Stunde steht das Herz dauernd in Diastole still. Der Frosch erholt sich nicht wieder.

Bemerkenswert ist noch als Erscheinung an Fröschen nach Injektion wirksamer Aconitindosen eine starke Sekretion der Haut und im Zusammenhang mit der schlechten Herztätigkeit häufiges Aufsperren des Maules.

Von *Laborde* und *Duquesnel* [2]) ist zum biologischen Nachweis des Aconitins die graphische Registrierung der Herzkurve, welche sie am ganzen Frosch aufnahmen, empfohlen worden. Demgegenüber ist zu bemerken, daß nicht gerade selten die charakteristische Herzperistaltik nach Injektion von Aconitin oder aconitinhaltigen Extrakten am ganzen Frosche vermißt wird, und daß dieser Nachweis darum ein unzuverlässiger ist. Hingegen lassen sich am isolierten Herzen (s. d.) noch kleinste Mengen Aconitin mit Sicherheit nachweisen *(Fühner)*.

Das dem Aconitin nahestehende Delphinin bringt ähnliche Erscheinungen am Herzen hervor wie ersteres, hat aber toxikologisch nur ge-

[1]) *(Kobert) Kakowski*, Über den direkten Einfluß verschiedener Substanzen auf das Herz. Arch. internation. de Pharmacodyn. et de Thérapie. T. **15**. p. 106 (1905).

[2]) *J. V. Laborde* et *H. Duquesnel*, Des Aconits et de l'Aconitine. Paris 1883. p. 267.

ringe Bedeutung. Von den Digitalisprodukten, welche gleichfalls Peristaltik des Froschherzens hervorrufen, unterscheidet sich die Aconitinperistaltik durch viel längere Dauer und den Übergang in diastolischen Stillstand des Herzens im Gegensatz zum systolischen Stillstand bei den Digitalisprodukten.

12. Der Nachweis von Muscarin.

Das reine Muscarin, der wirksame Bestandteil des Fliegenpilzes, besitzt keine forensisch-toxikologische Bedeutung. Bei Vergiftungen mit Fliegenpilzen wird die Diagnose immer am leichtesten auf botanisch-mikroskopischem Wege zu stellen sein. Wichtig ist aber die Kenntnis der charakteristischen Herzwirkung des Muscarins am Froschherzen, da beim Faulen von Eiweißstoffen Produkte mit Muscarinwirkung entstehen können (*Brieger*[1]), da solche im normalen Harn vorkommen (*Harmsen*[2], *Fühner*[3]) und durch Oxydation von Cholin erhalten werden (= künstliches Muscarin von *Schmiedeberg* und *Harnack*[4]).

Das Muscarin ruft, wie z. B. die Kalisalze, am Froschherzen diastolischen Stillstand hervor, welcher aber nach *Schmiedeberg*[5]) dadurch ausgezeichnet ist, daß er durch Atropin aufgehoben wird, wie er auch am atropinisierten Herzen nicht mehr auftritt.

Zur Verfolgung der Erscheinung am Frosche ist Freilegung des Herzens erforderlich (vgl. darüber die Angaben beim Nachweis von Substanzen mit Digitalinwirkung). Man injiziert dem auf dem Froschbrett aufgebundenen Tiere die zu prüfende Lösung in den Oberschenkellymphsack und beobachtet die Herztätigkeit. Während beim systolischen Stillstand, hervorgerufen durch Substanzen mit Digitalinwirkung, der Ventrikel des Herzens infolge maximaler Kontraktion blaß erscheint, ist er hier, im diastolischen Stillstand, bei maximaler Füllung dunkel. Mechanische Reizung löst noch Einzelpulse aus. Gibt man auf den stillstehenden Ventrikel einen Tropfen einer halbprozentigen oder auch schwächeren Lösung von Atropinsulfat, so treten schon sehr rasch wieder regelmäßige Herzpulse auf und bald erscheint die Herztätigkeit normal wie zuvor. Bei graphischer Registrierung der Herztätigkeit des narkotisierten Frosches kann man nach Muscarinvergiftung beobachten, daß beim Schwächerwerden der Pulse die Kurve, welche der Schreibhebel aufzeichnet, nicht mehr vollständig zur Abszisse absinkt, so daß systolische Wirkung, wie bei Digitaliskörpern,

[1]) *L. Brieger*, Über Ptomaine. Berlin 1885. S. 48.

[2]) *E. Harmsen*, Zur Toxikologie des Fliegenschwammes. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 50. S. 449 (1903).

[3]) *H. Fühner*, Über das Verhalten des synthetischen Muscarins im Tierkörper. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 61. S. 285 (1909).

[4]) *O. Schmiedeberg* und *E. Harnack*, Über die Synthese des Muscarins und über muscarinartig wirkende Ammoniumbasen. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 6 S. 101 (1877).

[5]) *O. Schmiedeberg* und *R. Koppe*, Das Muscarin, das giftige Alkaloid des Fliegenpilzes. Leipzig 1869. S. 29.

vorgetäuscht wird. Jedenfalls gelingt es am isolierten Herzen (s. d.) viel besser, den charakteristischen diastolischen Herzstillstand durch Muscarin aufzuzeichnen als am Herzen in situ, wenn auch hier durch Atropin die Muscarinwirkung als solche gekennzeichnet werden kann.

Bei der schwierigen Zugänglichkeit des reinen natürlichen Muscarins haben Angaben über dessen Wirkungsstärke am Frosche keine praktische Bedeutung. Vom künstlichen durch Oxydation von Cholin hergestellten Produkte ist **0·5—1** *mg* für kleine Wasserfrösche die mittlere tödliche Dose. Der Tod erfolgt nach vorausgehendem Herzstillstand durch allmähliche Erstickung des Tieres. Doch können sich Tiere auch von größeren Muscarindosen wieder erholen. Bemerkenswert ist die außerordentlich wechselnde Resistenz der Frösche nach Jahreszeit und Individuum gegenüber der Muscarinherzwirkung. Genaueres über diese Differenzen ist bei der Prüfung am isolierten Herzen angegeben.

C. Nachweis und Bestimmung von Giften an isolierten Organen.

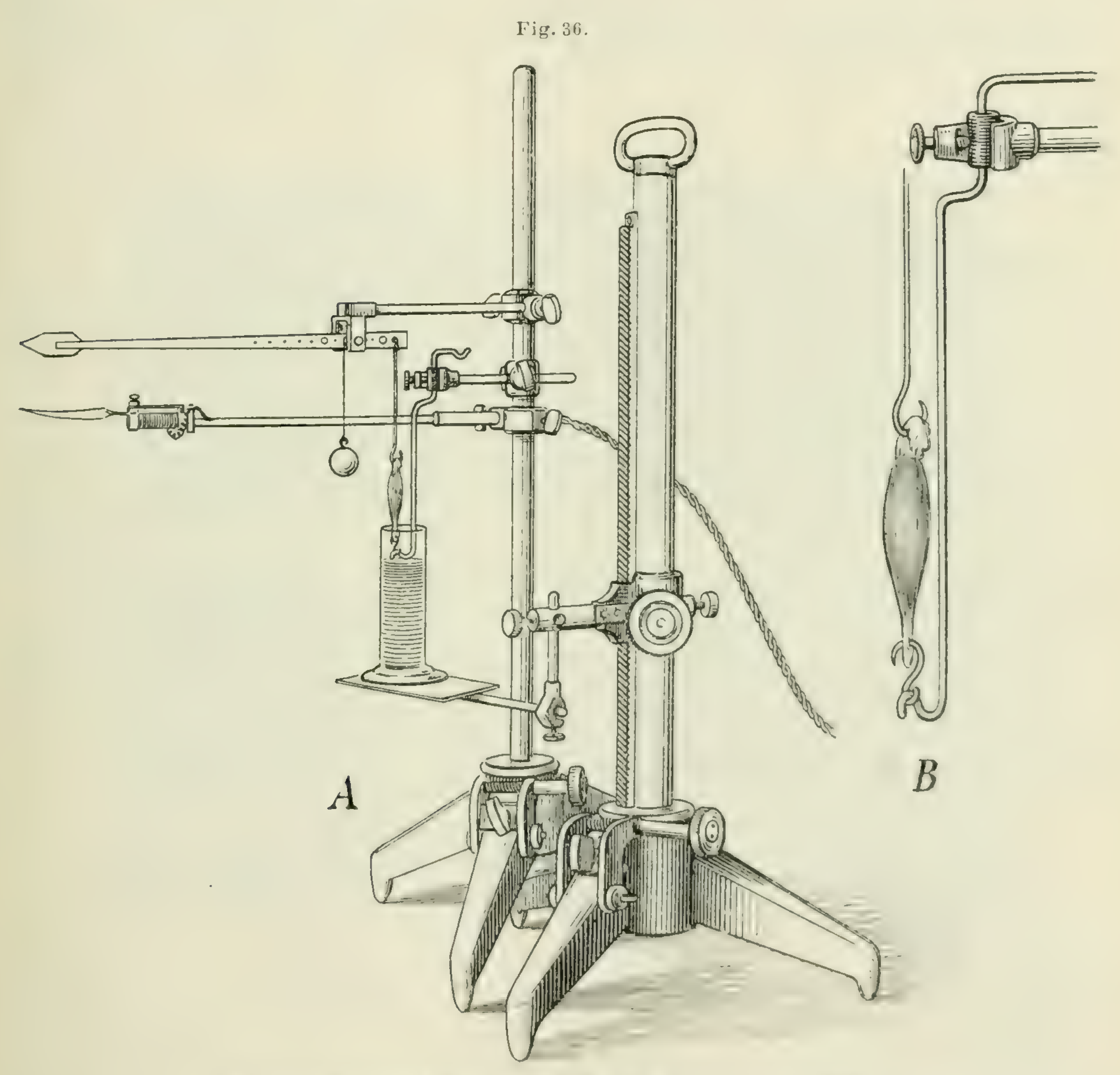
a) Prüfungen am Skelettmuskel.

Der isolierte Skelettmuskel des Frosches läßt sich zur Charakterisierung mehrerer Gifte verwenden, deren Nachweis hier zu besprechen ist.

Herstellung des Präparates. Als Muskel wird am besten der leicht zu präparierende Wadenmuskel, Musculus gastrocnemius, des Frosches gebraucht. Zu dessen Gewinnung wird der Frosch mit einem Scherenschlag geköpft und dem Tier darauf durch Einführung einer stumpfen Nadel (Stricknadel) in den Wirbelkanal das Rückenmark zerstört. Hierbei bekommt der Frosch einen Streckkrampf (Tetanus) und entleert den Inhalt der Harnblase. Bei Kaltfröschen hält der Streckkrampf längere Zeit an. Neben diesem Krampf beobachtet man häufig Zuckungen einzelner Muskelpartien. Man erfaßt den Frosch an den Hinterbeinen, eröffnet mit einem breiten Scherenschnitt die Bauchhöhle, entfernt deren Inhalt und schneidet dann das Tier in der Mitte quer durch über die Wirbelsäule. Von der zurückbleibenden hinteren Körperhälfte erfaßt man die über dem Rücken abstehende Haut zwischen Daumen und Zeigefinger der einen, die Wirbelsäule ebenso mit der anderen Hand und zieht die Haut über Hinterkörper und Schenkel ab. Beim Erfassen von Haut und Wirbelsäule zwischen Daumen und Zeigefinger nimmt man zweckmäßig ein Handtuch zu Hilfe. Das abgehäutete Froschhinterteil spaltet man oben im Becken in zwei Hälften. Die eine bewahrt man bis zur Verwendung in einer feuchten Kammer (Petrischale mit einigen Tropfen Ringerlösung) auf, von der anderen wird der Musculus gastrocnemius präpariert. Die Muskelpräparation geschieht am besten auf einer dicken Glasplatte. Zur Präparation müssen die Instrumente sowie die Glasplatte rein sein (kein Hautsekret!). Der Musculus gastrocnemius geht unten in eine starke weiße Sehne, die Achillessehne, über. Zur Isolierung des Muskels schneidet man die Sehne unterhalb der Ferse durch, erfaßt sie mit einer

Pinzette und präpariert den Muskel bis an seinen Ansatz in der Kniegegend frei. Den Muskel mit der einen Hand immer vermittelst der Pinzette an der Achillessehne haltend und hochziehend, durchschneidet man zunächst unterhalb des Kniegelenks den Unterschenkel und dann oberhalb den Oberschenkel und hat nunmehr ein Präparat des isolierten Muskels, wie aus Fig. 36 *B* ersichtlich ist.

Fig. 36.



Versuchsanordnung zum Einhängen des Muskels in Lösungen.

Will man lediglich feststellen, ob irgend eine zu untersuchende Lösung den Muskel chemisch reizt, so daß Kontraktionen desselben ausgelöst werden, so kann er ohne die Knochenteile präpariert und direkt an seiner Insertionsstelle am Oberschenkelknochen abgeschnitten werden. Man legt ihn dann zunächst in eine Schale mit etwa 30 cm^3 „Ringerlösung"[1]) und

[1]) Die froschisotonische nach *S. Ringer* hergestellte Lösung hat folgende Zusammensetzung: Natriumbicarbonat 0·1 *g*, trockenes Calciumchlorid 0·1 *g*, Kaliumchlorid 0·075 *g*, Natriumchlorid 6·0 *g*, destilliertes Wasser 1 *l*. Das Natriumbicarbonat muß im destillierten Wasser erst vollständig gelöst sein, bevor das Calciumchlorid zugesetzt wird.

beobachtet, ob derselbe hier ruhig bleibt. (In 0·7⁰/₀iger sogenannter „physiologischer Kochsalzlösung" können Zuckungen auftreten, welche durch Zusatz von Calciumchlorid unterdrückt werden.) Ist dies der Fall, so verbringt man den Muskel nach etwa ½ Stunde in die zu prüfende Lösung. Zur graphischen Registrierung der hier auftretenden Zuckungen dient die in Fig. 36 wiedergegebene Versuchsanordnung.

Zur Fixierung am Schreibhebel wird der Muskel nach Durchbohrung der an seinem oberen Ende noch vorhandenen Sehnen- und Knochenteile (mit der Scherenspitze oder einer Ahle) mit einem etwa 10 *cm* langen Draht versehen, dessen freies Ende umgebogen wird, zum Einhängen in eines der Löcher des Schreibhebels. In die Achillessehne wird ein kleiner Haken eingebohrt, was am besten gelingt beim Auflegen der Sehne auf ein Korkstückchen. Dieser Haken wird an einem starken mehrfach gebogenen Draht (Fig. 36 *A* und *B*) befestigt, der oben ein Stück Hartgummi trägt, zum Einklemmen im Stativ. Die den Schreibhebel tragende Muffe wird in der Höhe so eingestellt, daß der Schreibhebel horizontal steht. Bis zur Verbringung in die zu prüfende Giftlösung wird der Muskel in Ringerlösung eingesenkt, und zwar so tief, daß er völlig von Flüssigkeit bedeckt ist. Zum Einsenken dient ein zweites Stativ mit Zahnstange und Trieb, welches eine kleine horizontale Holzplatte trägt, auf die ein die Ringerlösung enthaltender Zylinder gestellt wird. Je nach der Weite des Zylinders sind 10—20 cm^3 Flüssigkeit nötig, um den Muskel völlig in die Lösung untertauchen zu können. Bei richtiger Aufstellung des Zylinders kann der Muskel ohne Erschütterung in die Flüssigkeit verbracht und wieder daraus entfernt werden. Unter dem Schreibhebel oder bequemer an einem dritten Stativ kann ein Markiermagnet zur Aufzeichnung der Zeit angebracht werden.

1. Der Nachweis von Guanidin.

Zum Nachweis kleiner Guanidinmengen verwendet man am besten kleine lebhafte Grasfrösche (20—30 *g*), deren Gastrocnemien sehr empfindlich gegenüber Guanidinlösungen sind. Die Muskeln, in mit Ringerlösung hergestellte Guanidinlösungen (salzsaures Salz) eingelegt, zeigen nach 5 bis 15 Minuten anfangs schwache, später stärker werdende Zuckungen, welche durch große Unregelmäßigkeit ausgezeichnet sind: Bald zuckt das Kopfende des Muskels, bald das Sehnenende, bald erfolgen die Zuckungen rasch, bald langsam; oft sind sie auf einzelne kleine Muskelbündel lokalisiert, dann zuckt wieder der ganze Muskel auf einmal. Sehr auffallend ist die Erscheinung an den abgehäuteten in Guanidinlösung eingelegten Füßen zu sehen.

Die Guanidinempfindlichkeit der Frösche ist sehr verschieden. Abgesehen davon, daß die Grasfrösche meist empfindlicher sind als die Wasserfrösche, zeigen sich auch Unterschiede an den Tieren derselben Art. In der Kälte treten die Zuckungen verspätet auf. Am besten geeignet sind in Zimmertemperatur gehaltene Frösche und Prüfung der Lösungen in

Zimmertemperatur. Durch Guanidinlösungen **1 : 10.000** bekommt man nahezu immer charakteristische Zuckungen an Gastrocnemien. Die äußerste Grenze, bei der Zuckungen im allgemeinen auftreten, sind Lösungen **1 : 15.000** bis **1 : 20.000.**

Die Guanidinzuckungen lassen sich, wenn sie in genügender Intensität vorhanden sind, graphisch registrieren, wie Fig. 37 zeigt. Kurve *a* ist bei langsamem, Kurve *b* bei rascherem Gange des Kymographions aufgenommen. Zur Registrierung dient am besten ein an der Achse wenig belasteter Strohhalmschreibhebel.

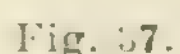
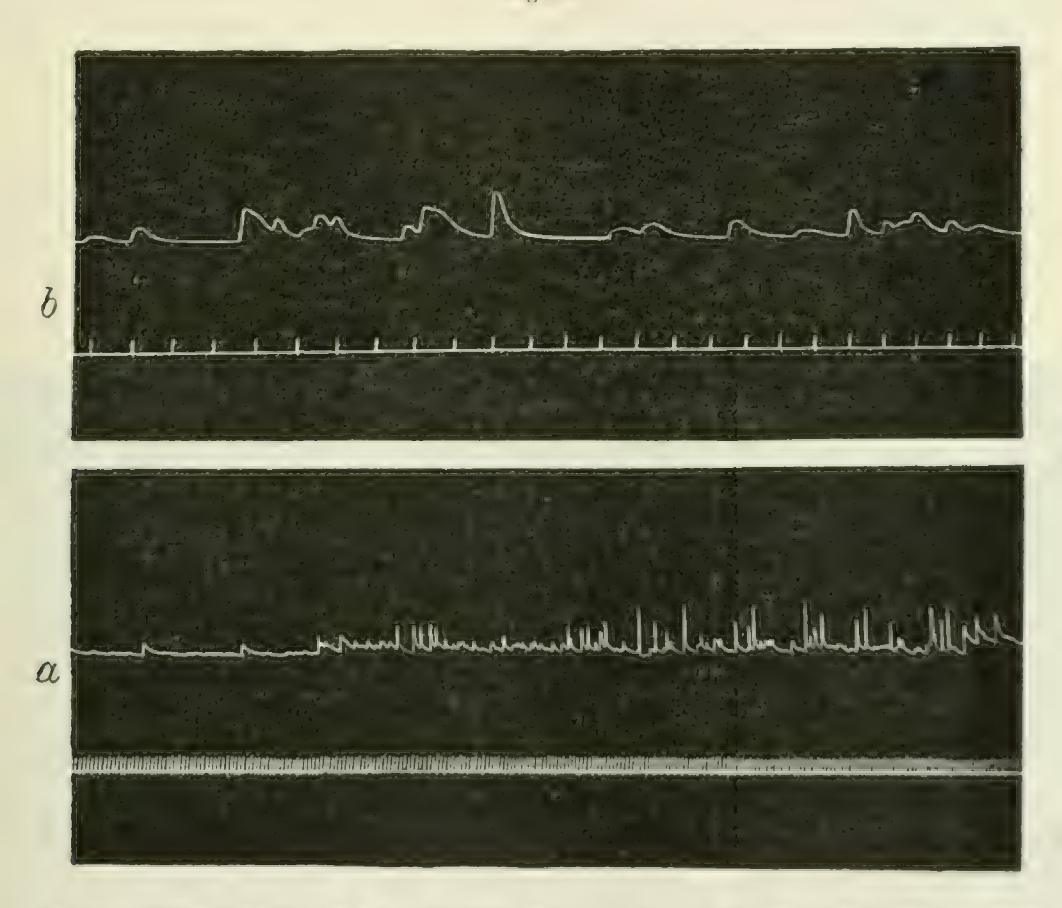


Fig. 37.



Rana esculenta. Männlich. 30 *g*. Isolierter Musc. gastrocnemius. Guanidin. HCl. 1 : 1000. *a* langsamer, *b* rascherer Trommelgang. Zeit = Sekunden.

Optimale Zuckungen der Gastrocnemien von Grasfröschen bekommt man in Lösungen von salzsaurem Guanidin **1 : 2000—1 : 5000.** Hier können die Zuckungen etwa 1 Stunde lang anhalten. In Lösungen **1 : 1000** und stärkeren gehen dieselben rasch vorüber. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die anfängliche Erregung des motorischen Nervenendes im Muskel, welche durch das Guanidin hervorgerufen wird, allmählich in eine curarinähnliche Lähmung desselben übergeht und dies in stärkeren Lösungen rascher erfolgt als in schwachen. Bringt man einen derartig gelähmten Muskel in Ringerlösung zurück, so treten erneut Zuckungen auf, welche anfangs maximal sind, später abnehmen und verschwinden. Die Guanidinwirkung ist also eine reversible (*Fühner*).

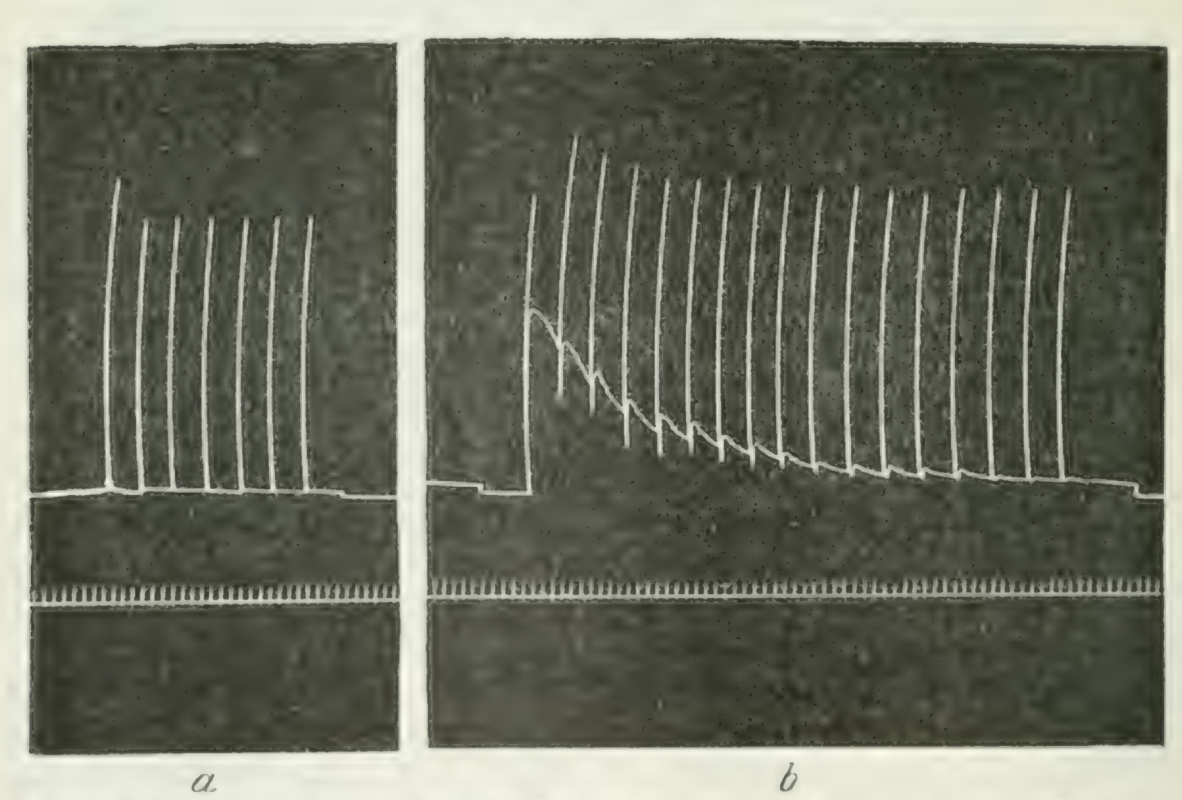
Zu bemerken ist, daß die Guanidinzuckungen durch Calciumchlorid, ähnlich wie diejenigen, welche durch Natriumchlorid am isolierten Muskel hervorgerufen werden, unterdrückt werden können. Es ist darum zweckmäßig, für die Guanidinversuche keine stärker kalkhaltige Ringerlösung als die auf S. 79 angegebene zu verwenden. Die Guanidinzuckungen werden ferner unterdrückt durch Curarin und andere Substanzen mit Curarinwirkung (quartäre Ammoniumverbindungen). Über Substanzen, welche die gleiche Wirkung wie das Guanidin besitzen, vgl. den Guanidinnachweis am ganzen Frosche.

Bei allen Prüfungen auf Guanidin ist der Gastrocnemius des einen Beines als Kontrollpräparat in Ringerlösung zu legen und nur der zweite in die zu prüfende Flüssigkeit zu verbringen.

2. Der Nachweis von Veratrin.

Das Veratrin läßt sich besser und mit weniger Substanz am isolierten Gastrocnemius als am ganzen Tiere (s. d.) nachweisen, gleichfalls

Fig. 38.



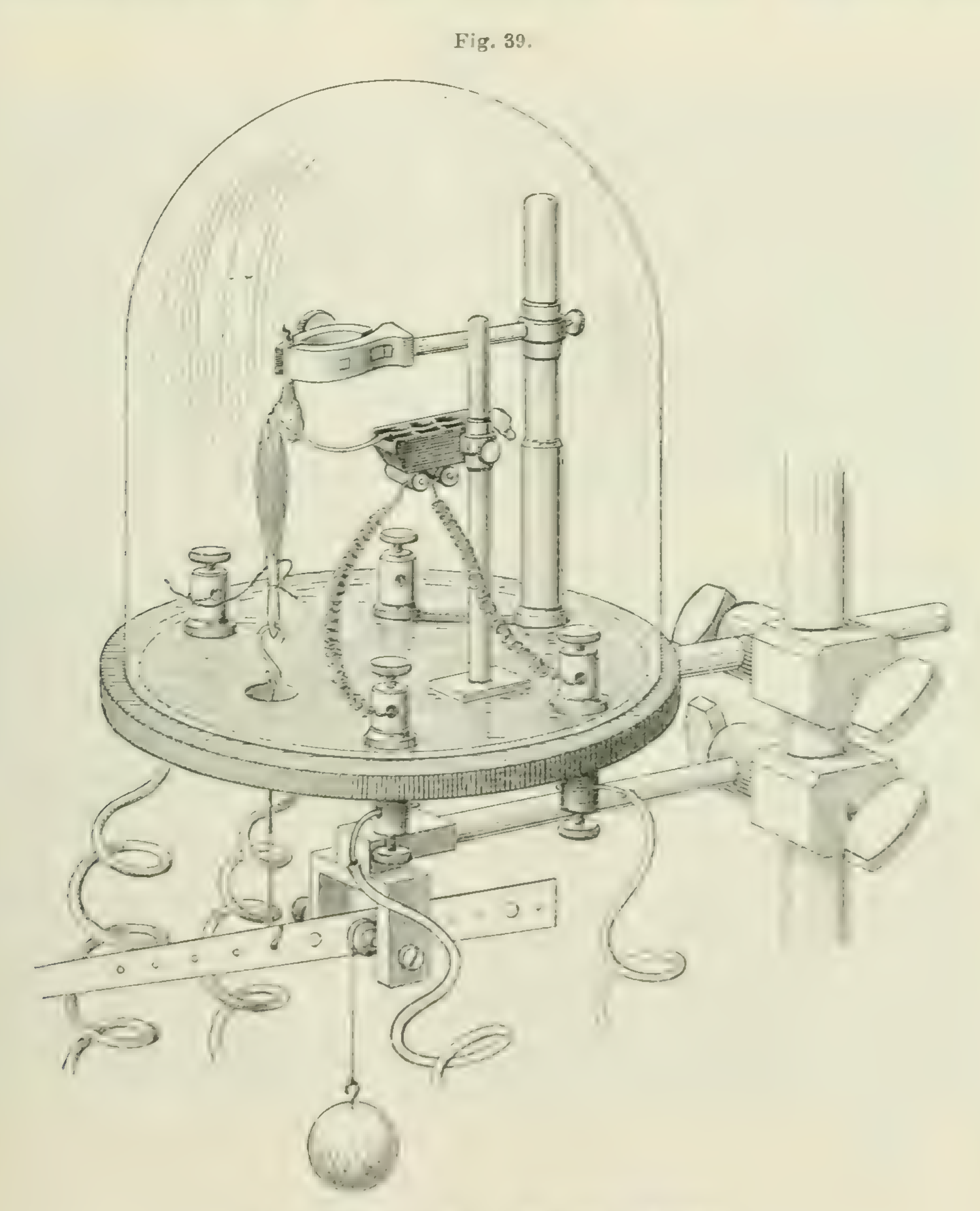
Rana esculenta, 35 g. Männlich. Isolierter Musc. gastrocnemius. a Normale Zuckungen. b Nachdem 5 Minuten in Veratrin HCl 1 : 1 Million eingehängt. Zeit = Sekunden.

unter Verwendung von Einzelinduktionsschlägen. Der Muskel kann hierbei wieder, wie angegeben, präpariert und zu Anfang der Prüfung in einen mit Ringerlösung gefüllten Zylinder eingehängt werden. Die Zuleitung des Stromes erfolgt einerseits durch einen Lamettafaden, welcher an dem vom Muskel zum Schreibhebel führenden Draht angeschlungen wird, anderseits durch den in einem Hartgummistück isolierten, als Muskelhalter dienenden

winkelig gebogenen Draht, an dessen freiem Ende eine Klemmschraube befestigt werden kann.

Die Reizung erfolgt wieder wie beim ganzen Tier mit Öffnungs- oder Schließungsinduktionsschlägen alle 3—5 Sekunden. Wie Fig. 38, Kurve *a* zeigt, welche unter diesen Bedingungen aufgenommen wurde, zeichnet man erst, solange der Muskel in Ringerlösung sich befindet, eine Serie normaler

Fig. 39.



Feuchte Kammer mit Nervmuskelpräparat.

Muskelzuckungen auf bei langsamem Trommelgang. Dann verbringt man den Muskel in die auf Veratrin zu prüfende Lösung. Enthält diese Veratrin im Verhältnis **1 : 1 Million** in Ringerlösung gelöst, so kann man schon nach 5 Minuten eine Serie dikroter (zweigipfeliger) Zuckungen bekommen, wie in Fig. 38 *b*. In dieser Versuchsanordnung braucht man 10—20 *cm*³ Veratrinlösung obiger Konzentration (= **1/100—2/100** ***mg***) zum positiven Ausfall der Reaktion.

Man kann aber an empfindlichen Muskeln kleiner gesunder Wasserfrösche noch mit **1** *cm*³ einer Lösung von salzsaurem Veratrin **1 : 500.000** bis **1 : 1 Million** (= **1 500—1 1000** *mg*) den charakteristischen Veratrineffekt hervorbringen, wenn man die isolierten Gastrocnemien nicht in die Lösung einhängt, sondern mit derselben bepinselt. Dies geschieht am besten in einer „feuchten Kammer", in welcher der Muskel aufgehängt wird und in der zugleich die elektrische Reizung vorgenommen werden kann.

Fig. 39 zeigt eine solche Kammer, welche sowohl zur direkten Muskelreizung, wie sie hier zur Verwendung gelangt, als auch zur indirekten Reizung des Muskels vom Nerven aus (vgl. Curarinnachweis) Verwendung findet.

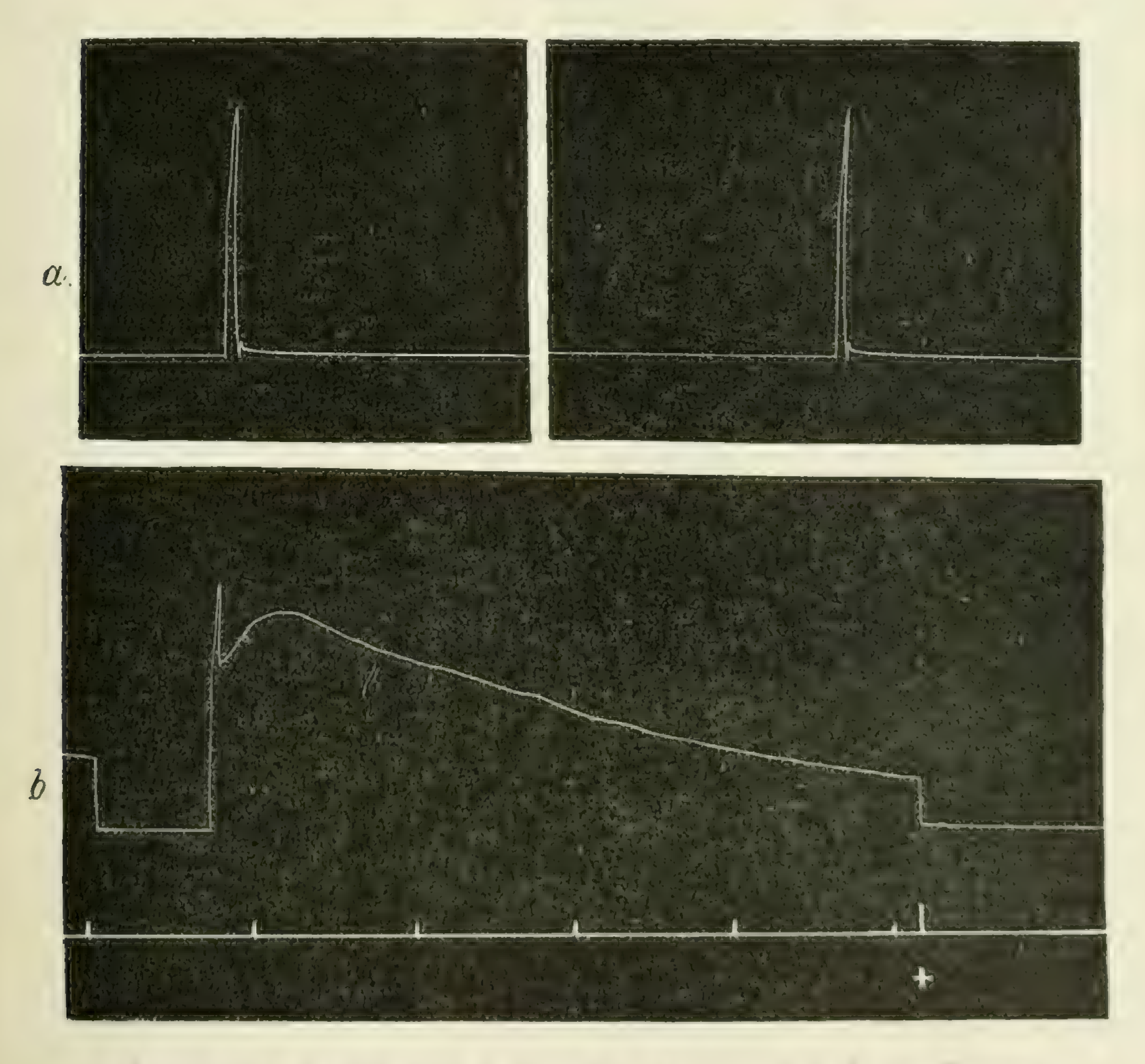
Die in der Abbildung wiedergegebene Kammer besteht aus einer Glasglocke, welche in die kreisförmige Rinne eines Hartgummitellers paßt. Ein an diesem angebrachter Metallstiel ermöglicht die Befestigung am Stativ. In der Kammer befinden sich zwei in der Höhe verstellbare kleine Stative, eines zur Fixierung des Muskels, das zweite zum Halten des Nerven am Nervmuskelpräparat bestimmt. Die zwei (in der Zeichnung) hinteren Klemmschrauben dienen der Zuleitung des elektrischen Stromes zum Muskel, die zwei vorderen zum Nerven. Am Muskelpräparat wird, wie aus der Abbildung ersichtlich, ein Stück des Oberschenkelknochens zum Festklemmen in der Stativkammer belassen. Das kleine Stativ ist mit der einen Klemmschraube metallisch verbunden. Die zweite Zuleitung vermittelt ein Lamettafaden von der zweiten Klemmschraube zum Muskel. Boden und Wände der Kammer werden zum Teil mit nassem Filtrierpapier belegt, um den Muskel vor dem Austrocknen zu schützen. Der Schreibhebel befindet sich in dieser Versuchsanordnung unter der Kammer. In einer Entfernung von 3—5 *mm* von der Achse kann der Muskel für den Veratrinversuch mit 50—70 *g* belastet werden.

Fig. 40 zeigt in der oberen Reihe zwei durch Einzelinduktionsschläge ausgelöste Einzelzuckungen eines normalen unvergifteten Gastrocnemius. In der unteren Reihe eine Einzelzuckung, aufgezeichnet 5 Minuten nach Bepinseln der Oberfläche des Muskels mit einem in Veratrinchlorhydrat (**1 : 500.000** in Ringerlösung) getauchten Haarpinsel. Die Kurven sind bei raschem Trommelgang aufgenommen. Natürlich können auch in dieser Versuchsanordnung Reihen wie in Fig. 38 aufgenommen werden. Nach je etwa 5 Minuten Pause läßt sich wieder eine neue charakteristische Reihe mit allmählich abnehmender Zweigipfeligkeit der Zuckungen aufnehmen. Der Veratrineffekt läßt sich auch bei kleinen Veratrinmengen stundenlang zeigen. Veratrinlösungen, welche stärker sind als **1 : 100.000**, eignen sich weniger gut zur Herbeiführung des charakteristischen Veratrineffektes. In Lösungen des salzsauren Salzes der Konzentration **1 : 10.000**, in welche Gastrocnemien eingehängt werden, geht die Erscheinung bald vorüber. In Lösungen **1 : 1000** und auch schon **1 : 10.000** zeigen die Muskeln beim Einhängen tonische Kontraktion wie in Nicotinlösung. Nachdem das Maximum der Kontraktion erreicht worden ist, bleibt der Muskel nicht

etwa in dieser Kontraktionsstellung wie beim Nicotin, sondern zeigt Tonusschwankungen [1], so daß der Schreibhebel eine Wellenlinie aufzeichnet, wobei sich die Kontraktur langsam wieder löst.

Antagonistische Beeinflussung des Veratrineffektes ist beobachtet worden durch Kaliumchlorid *(Buchanan)*, Äther *(Locke)* und Strophanthin *(Langley)*.

Fig. 40.



Rana esculenta. 35 *g*. Männlich. Isolierter Musc. gastrocnemius in feuchter Kammer. *a* 2 normale Zuckungen. *b* 1 Zuckung 5 Minuten nach Bepinseln mit Veratrin HCl 1 : 500.000. Bei (+) Kymographion arretiert. Zeit = Sekunden.

Über veratrinähnliche Wirkung bei anderen Substanzen vgl. die Angaben bei Nachweis des Giftes am ganzen Frosche.

3. Der Nachweis von Coffein und Theobromin.

Die pharmakologisch wichtigen Purinderivate, Coffein, Theobromin und Theophyllin, lassen sich biologisch durch eine Reaktion am Skelett-

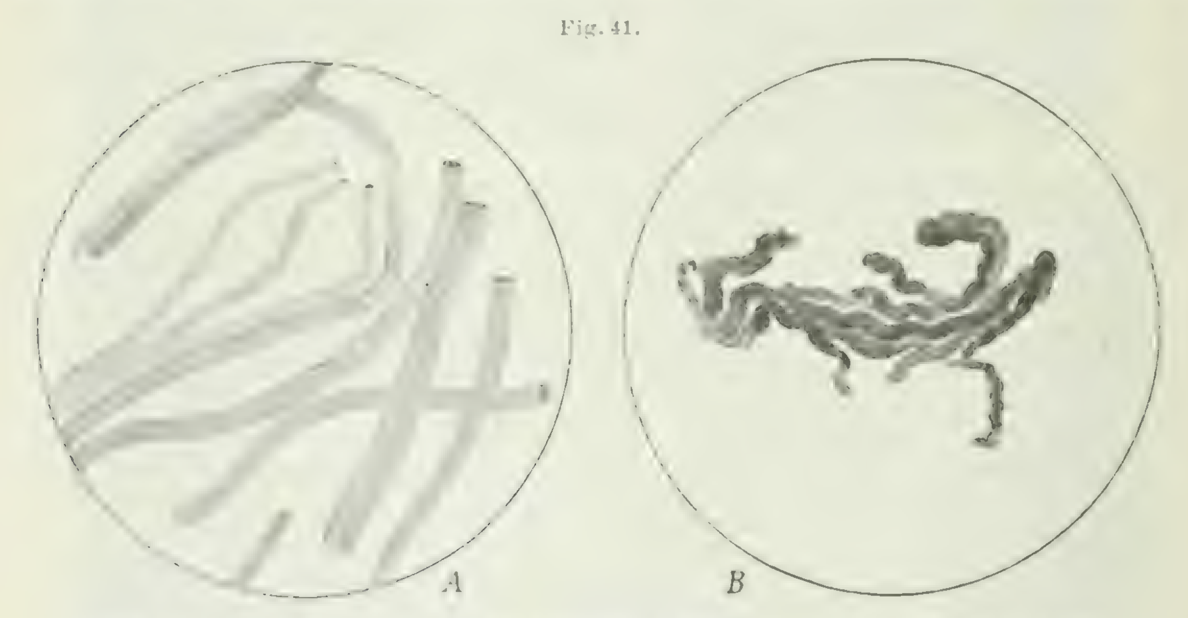
[1]) *C. G. Santesson*, Einiges über die Wirkung des Glyzerins und des Veratrins auf die quergestreifte Muskelsubstanz (Frosch). Skandinav. Arch. f. Physiol. Bd. 14 S. 20 (1903).

muskel des Frosches charakterisieren, welche zwar nicht sehr empfindlich ist, aber dennoch unter Umständen zum Nachweis dieser Substanzen Verwendung finden kann, da dieselben, sobald sie toxikologische Bedeutung gewinnen, auch schon in größeren Mengen vorhanden sein müssen.

Die Reaktion besteht darin, daß die Purinderivate, voran das Coffein, den Skelettmuskel in einen Zustand der *Verkürzung* und *Starre* versetzen, eine Erscheinung, welche derjenigen der Totenstarre oder der Erstarrung durch Wärme an die Seite zu stellen ist. Wie hier, so findet auch bei der Ausbildung der „*Coffeinstarre*“ ein Gerinnungsvorgang im Innern der Muskelfibrille statt, wobei der erst durchsichtige Inhalt unter Wasseraustritt undurchsichtig wird.

Legt man einen ganzen Musculus gastrocnemius eines Grasfrosches in eine starke, etwa 1%ige Coffeinlösung (in Ringerlösung) ein, so beobachtet man maximale Kontraktion, Hart- und Undurchsichtigwerden des

Fig. 41.



Rana temporaria. Muskelzupfpräparat. *A* normal. *B* nach Coffeineinwirkung. Vergr. 80fach.

Muskels. Auch noch beim Einlegen des Muskels in eine Lösung **1 : 1000** findet allmählich Kontraktion desselben statt. Doch ist der Gerinnungsvorgang unter diesen Bedingungen schlecht zu beobachten. Gut verfolgen läßt sich derselbe nur an den isolierten Muskelfasern, an einem „*Zupfpräparat*“ des Muskels. Zum Nachweis der Purinderivate sind Muskeln des Grasfrosches zu verwenden, da an ihnen die Erscheinung noch in größerer Verdünnung ausgelöst wird als an Muskeln des Wasserfrosches.

Ausführung der Prüfung. Von einem kleinen munteren Grasfrosche stellt man ein von der Haut befreites Präparat der Hinterbeine her und verbringt dasselbe in eine feuchte Kammer (Petrischale mit wenig Ringerlösung). Entsprechend der Längsrichtung der Muskulatur des Ober- oder Unterschenkels schneidet man ein etwa $^1/_2$ *cm* langes Stückchen aus irgend einem Muskel aus, verbringt es auf ein Uhrglas und zerfasert es in einem Tropfen Ringerlösung mittelst zweier Präpariernadeln. Fig. 41 *A*

zeigt bei etwa 80facher Vergrößerung einen Ausschnitt aus einem so gewonnenen Zupfpräparat. Gibt man hierzu einen Tropfen Coffeinlösung, so beobachtet man unter dem Mikroskop rasches Zusammenkrümmen und sofortiges Undurchsichtigwerden der anfänglich geraden und durchscheinenden Muskelfasern. Das Präparat nimmt die Form an, wie dies in Fig. 41 *B* dargestellt ist. Nach *Schmiedeberg*[1]) genügt eine Coffeinkonzentration **1:4000** zur Auslösung des Gerinnungsvorganges. Nach Bestimmungen von *Jacobj* und *Golowinski*[2]) an den Doppelsalzen mit Natriumsalicylat ist das Theobromin etwa halb, das Theophyllin etwa ein Viertel so wirksam als das Coffein an den Muskelfibrillen von Grasfröschen.

b) Prüfungen am Nervmuskelpräparat.

Der Nachweis von Curarin.

Das Nervmuskelpräparat des Frosches, bestehend aus dem Musculus gastrocnemius und dem diesen innervierenden Nervus ischiadicus, soll hier lediglich in seiner Verwendung zur Charakterisierung von Substanzen mit Curarinwirkung besprochen werden. Das Nervmuskelpräparat besitzt hierzu dem ganzen Frosche gegenüber den Vorzug, daß man die Curarinwirkung graphisch registrieren kann und daß sich hierbei noch geringe Grade der Curarinwirkung, welche nicht zur völligen peripheren Lähmung des Tieres führen, als solche kennzeichnen lassen.

Reizt man den mit seinem Nerven in Zusammenhang präparierten Musculus gastrocnemius eines gesunden kräftigen Frosches rhythmisch indirekt (d. h. vom Nerven aus) alle 2–3 Sekunden mit Einzel-(Öffnungs- oder Schließungs-)Induktionsschlägen, so bekommt man bei graphischer Registrierung eine nur äußerst langsam absinkende Reihe von Zuckungen. Der Anfang einer solchen Reihe nahezu gleichhoher Zuckungen ist in Fig. 42 *a* wiedergegeben. Eine ähnliche Reihe erhält man auch bei direkter Reizung des Muskels (Fig. 42 *c*). Anders beim Frosche nach Curarinvergiftung. Stellt man hier ein Nervmuskelpräparat her zu einer Zeit, in welcher der Frosch noch nicht vollständig peripher gelähmt ist, und reizt rhythmisch vom Nerven aus, so erhält man statt der langgestreckten, oft erst nach mehrstündiger Reizung langsam absinkenden Reihe stark verkürzte sogenannte „Ermüdungsreihen". Der vollständigen Lähmung der motorischen Nervenenden geht nach *Boehm*[3]) ein Stadium leichter Ermüdbarkeit derselben voraus und dieses kann zum Nachweis von Substanzen mit Curarinwirkung verwertet werden.

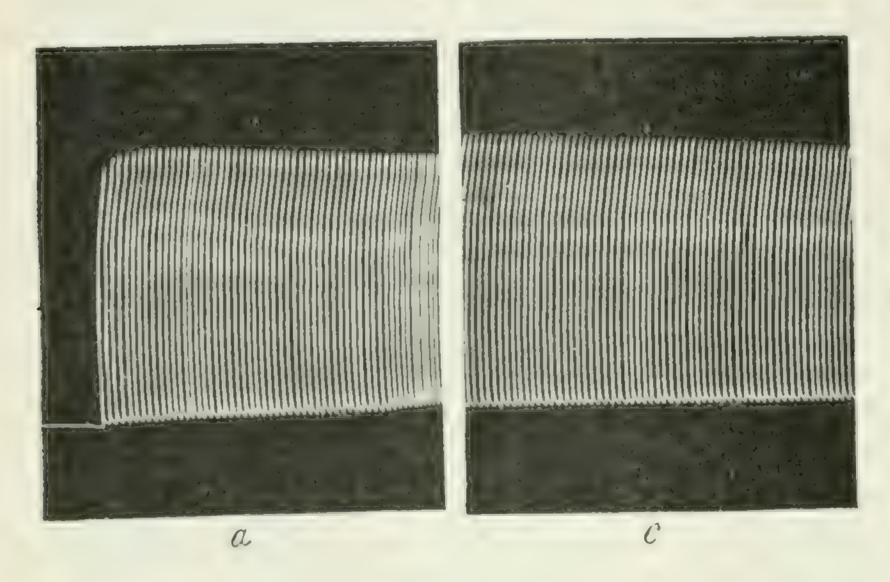
[1]) *O. Schmiedeberg,* Grundriß der Pharmakologie. 6. Aufl. Leipzig 1909. S. 95.

[2]) *C. Jacobj* und *Golowinski,* Ein Beitrag zur Frage der verschiedenen Wirkung des Coffeins auf Rana esculenta und Rana temporaria. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Supplement. 1908. S. 293.

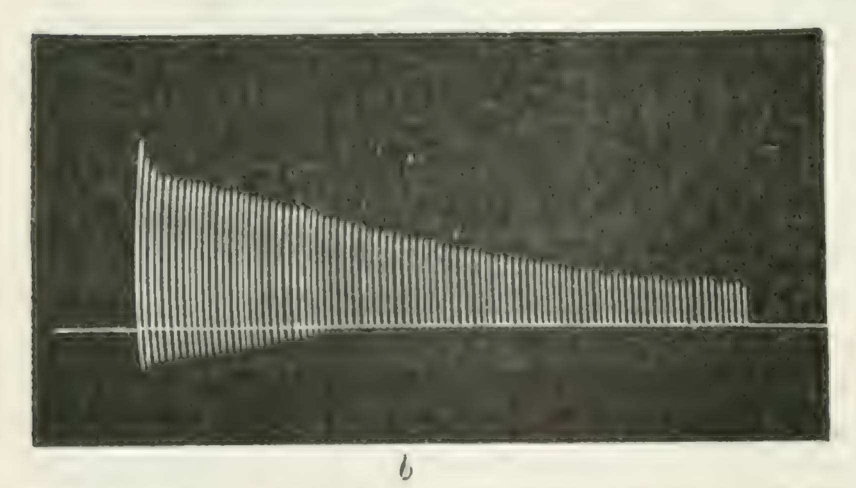
[3]) *R. Boehm,* Einige Beobachtungen über die Nervenendwirkungen des Curarin. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 35. S. 16 (1895).

Will man derartige Ermüdungsreihen erhalten, wie eine solche in Fig. 42 *b* wiedergegeben ist, so muß man das Nervmuskelpräparat des Frosches herstellen, solange das Tier noch nicht reflexlos ist, also Reizübertragung vom Nerven auf den Muskel noch erfolgt. Bei Injektion lähmender Giftmengen muß weitere Giftzufuhr zum Nervenende durch Unterbrechung der Zirkulation, etwa 20—30 Minuten nach Injektion der Lösung in den Brustlymphsack, verhindert werden, zu einer Zeit, wo das Tier noch vermag, sich aus der Rückenlage umzuwenden. Ist der Frosch hierzu nicht mehr imstande, so bekommt man bei Applikation von Einzelinduktionsschlägen am isolierten Nervmuskelpräparat vom Nerven aus meist keine Zuckungen mehr.

Fig. 42.



a *c*



b

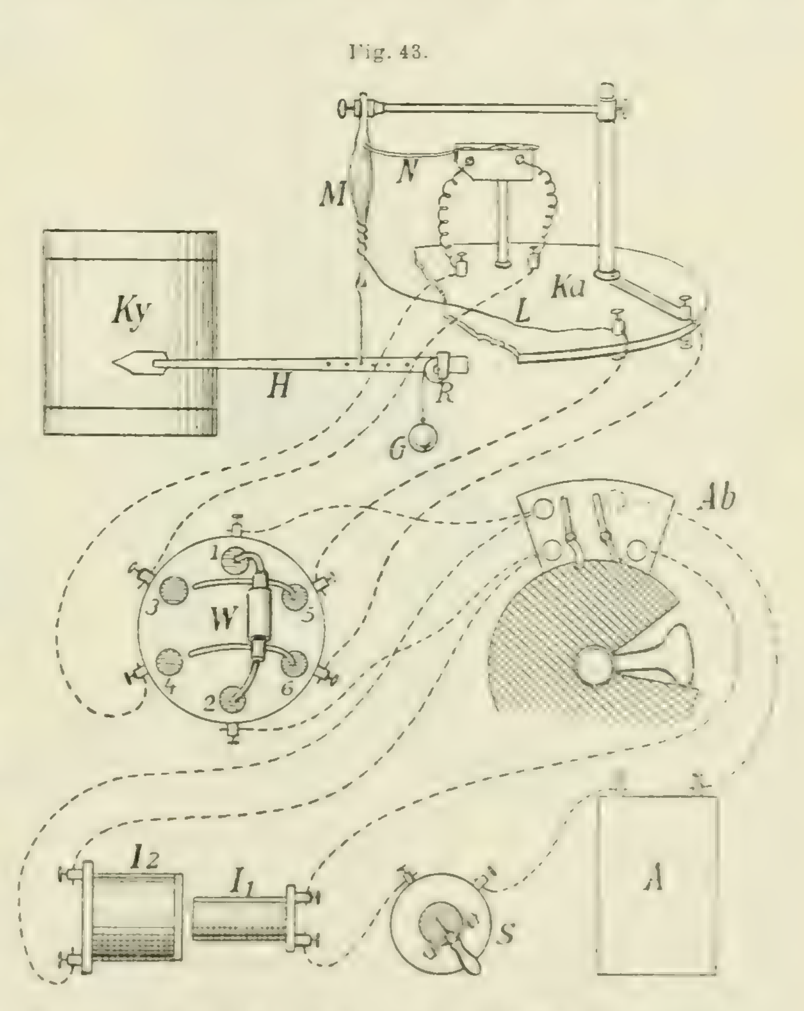
Rana esculenta. 65 *g*. Weiblich. 2 Nervmuskelpräparate nach Curarinvergiftung. *a* Nervenreizung am normalen, *b* am vergifteten Präparat. *c* Direkte Muskelreizung am vergifteten Präparat, 3 Sekunden-Öffnungsschläge.

Zu dem Versuche bedarf man einer gut funktionierenden Abblendungsvorrichtung, um den Muskel teils direkt, teils indirekt rhythmisch alle 2—3 Sekunden durch Öffnungs- oder Schließungsinduktionsschläge reizen zu können. Neben dem Abblender ist ein Stromwender (Wippe), eine feuchte Kammer, Induktionsapparat, Quecksilberschlüssel und Akkumulator erforderlich.

Die Versuchsanordnung ist in Fig. 43 dargestellt. Der primäre Stromkreis verbindet den Akkumulator *(A)* mit Quecksilberschlüssel *(S)*, primärer Rolle *(I_1)* und zwei Polen des *Frank*schen Abblenders *(Ab)*; der sekundäre Stromkreis verbindet die sekundäre Rolle des Induktionsapparates *(I_2)* mit den beiden anderen Polen des Abblenders. Von diesen Polen führen außerdem zwei Drähte zu der Wippe *(W)*, und zwar zu den Quecksilbernäpfen *1* und *2*. Von der Wippe gehen von den Quecksilber-

näpfen *3—6* vier Drähte zu den Klemmschrauben der feuchten Kammer (*Ka* und Fig. 39). Davon führen (in der Fig. 43) die Drähte von Napf *3* und *4* zum kleinen Stativ in der Kammer, welches den Nerven (*N*) trägt, während die Drähte, welche von Napf *5* und *6* abgehen, der Stromzuführung zum Muskel (*M*) dienen. Diese geschieht einerseits durch das kleine, den Muskel tragende Stativ, andrerseits durch einen, Klemmschraube und Muskel verbindenden, ausgeglühten Lamettafaden (*L*). Der Abblender, welcher in der Muffe eines Stativs befestigt ist, wird am besten mit einem langsam gehenden Elektromotor in Umdrehung versetzt, und zwar für den Curarinnachweis so, daß eine Umdrehung in 2 oder 3 Sekunden erfolgt.

Fig. 43.

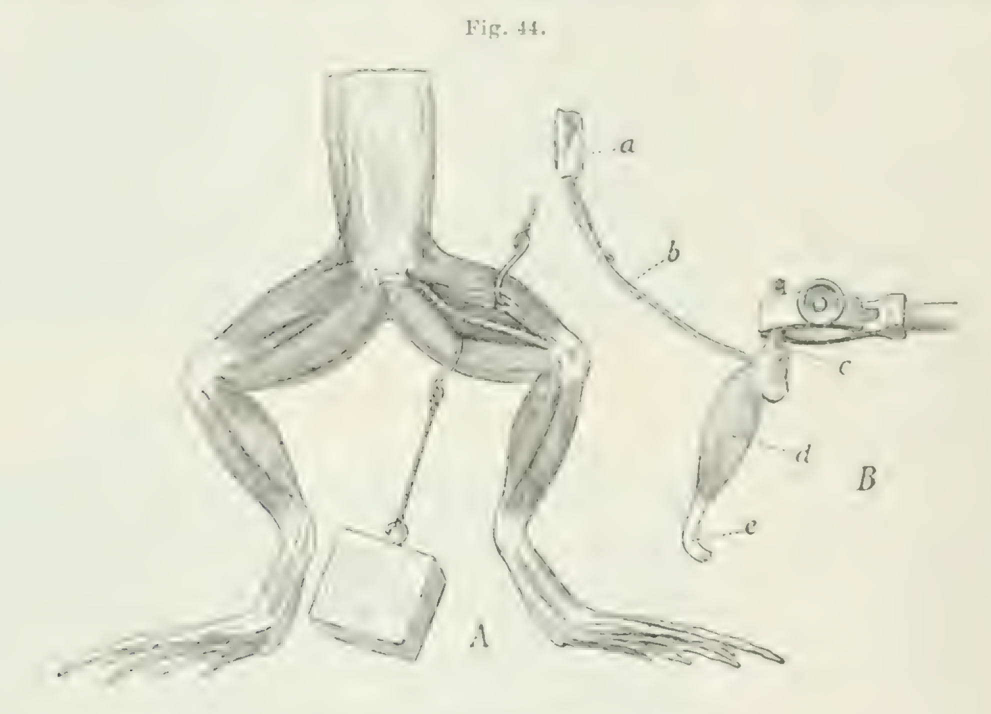


Versuchsanordnung zur rhythmischen elektrischen Reizung des Nervmuskelpräparates mit Öffnungs- oder Schließungsinduktionsschlagen.

Herstellung des Nervmuskelpräparates. Nachdem der in den Brustlymphsack injizierte Frosch beginnende Lähmung zeigt, wird der Kopf abgeschnitten und das Rückenmark zerstört. Dann schneidet man das Tier, nach Eröffnung der Bauchhöhle und Entfernung der Eingeweide, unter den Armen durch, zieht die Haut von dem Hinterkörper ab und legt zur weiteren Präparation auf eine reine Glasplatte. Hier entfernt man noch etwa vorhandene Eingeweidereste (Niere, Blase) und legt dadurch die beiden aus der Wirbelsäule austretenden und nach den Hinterbeinen ziehenden glänzenden Nervenstränge frei (vgl. Fig. 56). Mit einem Scherenschnitt halbiert man nun die Wirbelsäule unter Schonung der Nervenstränge und verlängert diesen Schnitt genau median durch das Becken des Frosches hindurch. Bei der Schnittführung durch das Becken werden die Hinterbeine zweckmäßig in der Schenkelbeuge maximal nach oben gebeugt. Wird der Schnitt nicht genau durch die Mitte des Beckens geführt, so wird leicht das Nervenbündel der einen Seite verletzt. Das eine Bein wird nun in eine Petrischale mit etwas Ringerlösung gebracht, während von dem

anderen das Nervmuskelpräparat hergestellt wird. Das Aussehen des fertigen Präparates ist aus Fig. 44 *B* zu entnehmen. Zur Präparation schiebt man die Schere an der Austrittsstelle der Nerven aus der Wirbelsäule platt unter denselben durch und schneidet die Wirbelsäule quer ab, so daß ein Stück derselben *(a)* mit dem Nervenstrang in Zusammenhang bleibt. Dieses Stück erfaßt man mit der Pinzette und präpariert den Nervenstrang frei, soweit er im Becken verläuft. Dann dreht man das Präparat auf die Bauchseite um, damit man den Nervus ischiadicus am Oberschenkel isolieren kann. Zu dem Zwecke zieht man die Muskulatur des Oberschenkels auseinander (vgl. Fig. 44 *A*), geht mit dem stumpfen Scherenblatt unter dem Nerven durch und durchschneidet die Muskulatur des Oberschenkels und den Oberschenkelknochen *(c)*, dessen halbe Länge mit dem Knie in Ver-

Fig. 44.



Herstellung des Nervmuskelpräparates.

bindung bleiben muß. Der Nerv wird durch kräftiges Auseinanderziehen der Muskulatur nach obenhin weiter verfolgt und freigelegt und die Verbindung mit dem Beckenstücke durch Entfernung der noch vorhandenen Muskel- und Knochenteile hergestellt. Die kleineren Seitenäste des Nervenbündels werden abgeschnitten (Fig. 44 *B* in der Nähe von *b*) und schließlich auch die den Nerven begleitende schwarz aussehende Arterie entfernt. Am Oberschenkel wird der Nerv dann bis zu seiner Gabelung und diese weiterhin bis zum Knie verfolgt. Während der ganzen Präparation darf der Nerv niemals mit der Pinzette erfaßt werden. Als Handhabe dienen immer entweder das Stück noch vorhandener Wirbelsäule oder Ober- und Unterschenkel. Der Nerv wird jetzt auf ein mit Ringerlösung getränktes Wattestück gelegt und der Oberschenkelknochen von den ihn noch umgebenden Muskelstücken bis zum Knie befreit. Dann wird der Musculus gastrocnemius *(d)* in früher (S. 78) angegebener Weise im Zusammenhang mit

der Achillessehne *(c)* präpariert und der Unterschenkel unterhalb des Knies abgeschnitten. Das fertige Nervmuskelpräparat wird vermittelst des Oberschenkelknochens in der Stativklammer der feuchten Kammer befestigt, nachdem vorher noch ein Haken in der Achillessehne angebracht wurde. Der Nerv wird über die Elektroden des für ihn bestimmten Hartgummitroges gelegt und in seiner ganzen Länge bis zum Beginn des Versuches mit in Ringerlösung getränkter Watte bedeckt. Der Muskel (Fig. 48 *M*) wird durch ein Stück Draht mit dem unterhalb der feuchten Kammer befindlichen Schreibhebel *(H)*, der in der Nähe der Achse *(B)* mit 50—70 *g* *(G)* belastet ist, verbunden, außerdem in der Kammer mit dem zweiten Pol durch einen Lamettafaden *(L)*.

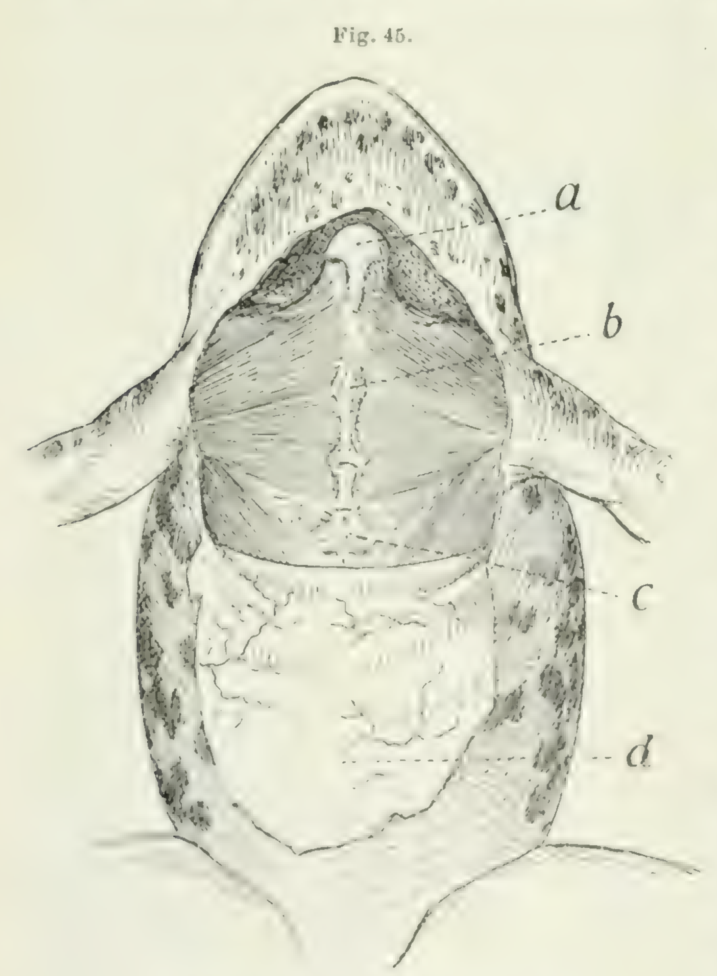
Zu Beginn des Versuches stellt man die Wippe erst so ein, daß der Muskel elektrisch gereizt wird. Man stellt die sekundäre Rolle des Induktionsapparates zunächst möglichst weit entfernt von der primären und nähert dann so lange, bis der Muskel auf der berußten Fläche des Kymographions *(Ky)* maximale Zuckungen aufzeichnet. Maximal sind die Zuckungen z. B. bei Rollenabstand 12 oder 10 *cm*, wenn dieselben auch bei weiterer Annäherung, z. B. bei 6 oder 7 *cm*, nicht mehr höher werden. Die Reizung des Muskels darf nur so stark sein, daß sich keine Kontraktur desselben ausbildet. Diese Erscheinung besteht darin, daß der Muskel sich bei übermaximalen Reizen nicht mehr auf seine ursprüngliche Länge ausdehnt. Nachdem man festgestellt hat, daß die Versuchsanordnung keine Störungen aufweist und der Muskel bei etwa 10 *cm* Rollenabstand bei direkter Reizung maximale Zuckungen gibt, schaltet man die Wippe um auf die Nervenreizung. Bei unvergiftetem Nerven bekommt man von diesem aus Zuckungen des Muskels bei viel größerem Rollenabstand als bei direkter Muskelreizung. Beim mit Curarin teilweise vergifteten Präparat wird man erst vielleicht bei 10 oder 15 *cm* Rollenabstand maximale Zuckungen vom Nerven aus erhalten. Nachdem man diese Grenze möglichst rasch festgestellt hat, läßt man bei ihr eine erste „Ermüdungsreihe" aufzeichnen. Zeigt der Muskel nur noch schwache Zuckungen, so öffnet man den Quecksilberschlüssel und läßt das Präparat 10 Minuten lang sich erholen. Dann wird eine zweite und nach abermaligen Pausen eine dritte und vierte Reihe aufgezeichnet. Die Reihen werden jedesmal kürzer. Schließlich bekommt man selbst bei völlig übereinandergeschobenen Rollen des Induktionsapparates keine Zuckungen mehr. Man reizt dann den Muskel statt mit Einzelinduktionsschlägen mit kurz dauernden tetanisierenden Strömen anfangs bei etwa 10 *cm* Rollenabstand. Schließlich werden auch diese Reize unwirksam und das Nervmuskelpräparat ist indirekt völlig unerregbar geworden. Jetzt zeichnet man wieder mit Einzelinduktionsschlägen bei direkter Muskelreizung eine längere Reihe auf, um sich von der Intaktheit des Muskels zu überzeugen. Ist die Vergiftung des Frosches zur Zeit seiner Präparation schon zu weit vorgeschritten, so bekommt man bei Einzelinduktionsschlägen selbst bei völlig übereinandergeschobenen Rollen des Induktionsapparates keine Zuckungen mehr. Meist ist aber dann wenigstens die tetanisierende Reizung noch wirksam.

Hat man nur Giftmengen zur Verfügung, welche nicht zur völligen Lähmung des Frosches führen, so wird man am besten bei dem zur Prüfung dienenden Frosche erst das eine Bein nach *Cl. Bernard* (vgl. S. 59, 60) präparieren, dann den Frosch vergiften und nach etwa 1 Stunde die Nervmuskelpräparate herstellen. Man prüft erst das vergiftete, dann das durch die Ligatur vor der Gifteinwirkung geschützte Bein. Auf diese Weise werden auch noch geringe Grade von Curarinwirkung festgestellt werden können. Die in Fig. 42 wiedergegebenen Kurven sind in dieser Weise, allerdings unter Verwendung lähmender Curarinmengen, von demselben Wasserfrosche gewonnen.

c) Prüfungen am Herzmuskel.

Das isolierte Herz des Frosches soll hier in seiner Verwendung zum Nachweis von Digitalisprodukten, von Aconitin und Muscarin und zur quantitativen Bestimmung des letzteren besprochen werden.

Fig. 45.



Präparation des Froschherzens. I.

Zur Herstellung des Präparates verwendet man am besten große Wasserfrösche (60—100 *g*). Bei einiger Übung gelingt die Einführung einer Kanüle in das pulsierende Herz aber auch an kleineren Tieren.

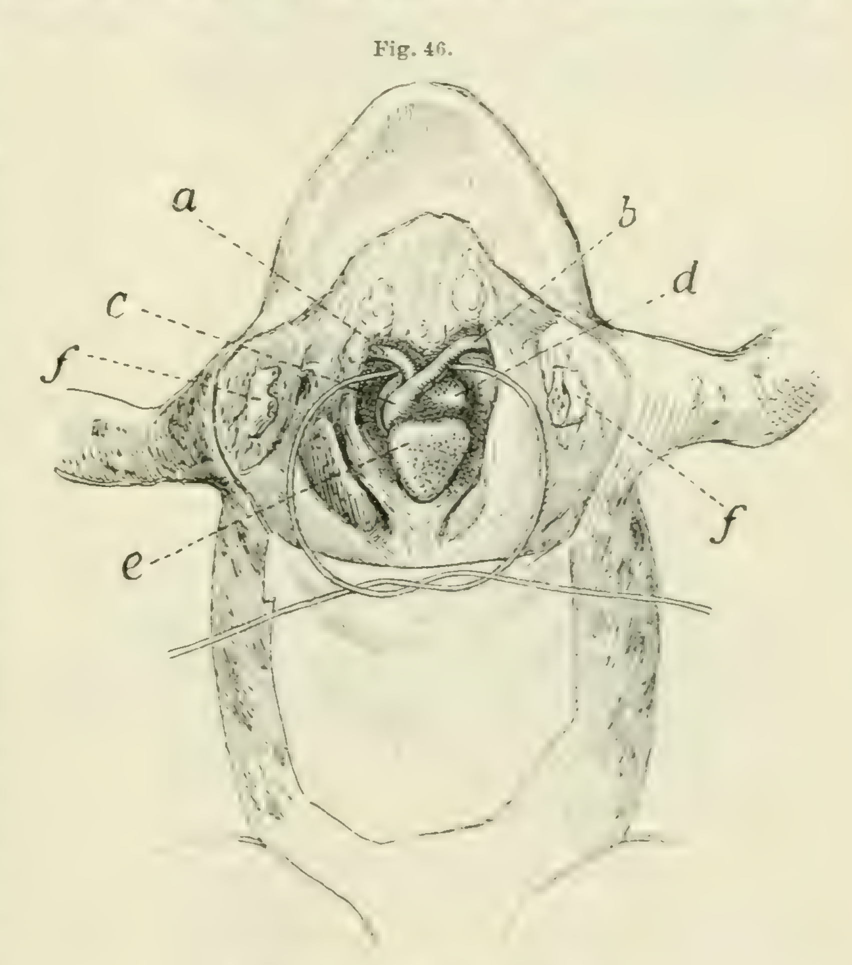
Anfertigung des Präparates. Zur Isolierung des Herzens braucht man neben einer Hakenpinzette und einer größeren Schere zwei feine Pinzetten und eine feine Schere. Dann ist starker Leinenfaden, Herzkanüle und Herzklammer weiterhin nötig. Das isolierte Herz wird in einer Glaskammer (Fig. 52) befestigt, an deren Boden Ringerlösung sich befindet, durch welche Sauerstoff perlt. Die Herzbewegung wird auf einen leichten Schreibhebel übertragen, welcher sie auf der berußten Papierfläche des Kymographions in gewünschter Vergrößerung aufschreibt. Unter der Herzkurve wird die Zeit aufgezeichnet.

Vor Beginn der Präparation füllt man eine kleine Kristallisierschale mit Ringerlösung und legt in dieselbe die der Größe des Frosches ent-

sprechende Herzkanüle (Fig. 49), damit sie sich in ihrem unteren Drittel mit Ringerlösung füllt. Außerdem legt man zwei je etwa 20 *cm* lange Leinenfäden zurecht zum Abbinden des Herzens. Dann ergreift man den Frosch mit der einen Hand, führt die Schere in das Maul ein und schneidet den Kopf ab, wobei der Unterkiefer stehen bleibt. Nach Zerstörung des Rückenmarks wird der Frosch auf einen gewöhnlichen Teller gelegt, wobei der Unterkiefer zweckmäßig auf dem Tellerrand aufliegt. Das Tier ist mit der Kopfseite zunächst dem Operierenden zugekehrt. Mit einer Hakenpinzette erfaßt man die Haut am Unterkiefer und präpariert mit der Schere einen großen und breiten Hautlappen (Fig. 45 *d*), welcher über den Bauch umgelegt wird.

Zur Entfernung des für das Herz schädlichen Hautsekretes wird die Schere nunmehr abgewaschen. Dann wird das obere knorpelige Ende des Brustbeins *(a)* mit gewöhnlicher Pinzette erfaßt und in der Mitte gespalten. Dieser Schnitt wird weiter nach unten hin durch das Brustbein *(b, c)* verlängert, wobei der stumpfe Ast der Schere dicht unter dem Knochen vorgeschoben wird. Der Schnitt wird in die Bauchmuskulatur fortgesetzt, in welche dann zwei seitliche Einschnitte zur Erweiterung der Lücke gemacht werden. Dem gleichen Zwecke dient das hierauf folgende Abtragen des Brustbeins auf beiden Seiten bis zu den Knochen der oberen Extremität (Fig. 46 *f*). Hierbei ist darauf zu achten, daß die Leber und namentlich die daransitzende Gallenblase nicht verletzt wird. Nunmehr wird der Teller umgedreht, so daß die Kopfseite des Frosches vom Operierenden abgekehrt ist. Über dem pulsierenden Herzen sieht man als dünne durchsichtige Haut den Herzbeutel, der manchmal bei der Durchtrennung des Brustbeins schon angeschnitten wird. Diesen erfaßt man an irgend einer Stelle mit feiner Pinzette, schneidet, sofern er noch unverletzt, eine Öffnung in denselben, die man dann nach oben hin er-

Fig. 46.

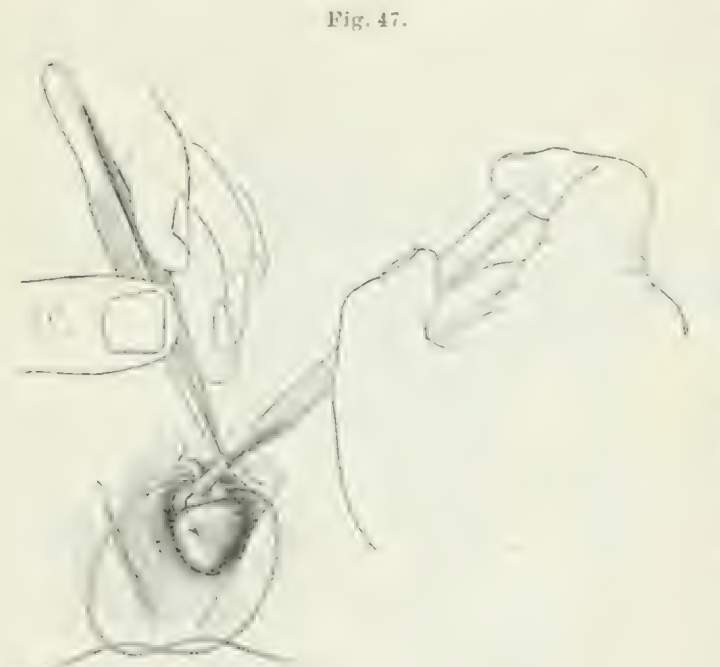


Präparation des Froschherzens. II.

weitert, so daß der Herzbeutel bis oben an seine Anheftungsstellen an den Aorten vollständig gespalten ist und das Herz (*d* = Vorhof, *e* = Ventrikel) frei daliegt. Bemerkt sei noch, daß manchmal die Lungen prall gefüllt sind und die weitere Präparation des Herzens stören. Nach einem kleinen Einschnitt fallen dieselben zusammen.

Die beiden Aortenbögen (Fig. 46 *a* und *b*) kommen aus einem gemeinsamen Stamme, der seinerseits aus dem Bulbus cordis (*c*) hervorgeht. Unter der Verzweigungsstelle der Aorta schiebt man eine feine Pinzette vorsichtig durch, erfaßt mit derselben den einen bereitliegenden Faden und zieht ihn unter dem Gefäße hindurch. Die beiden Fadenenden schlingt man schon, wie in der Figur sichtbar, übereinander, um später die Ligatur rascher anlegen zu können. Man erfaßt dann eine kleine Stelle der Wand des linken Aortenbogens mit feiner Pinzette und schneidet mit feiner Schere das Gefäß an. Die Öffnung muß so groß sein, daß man mit der Kanüle bequem eingehen kann. Hierzu hält man mit der linken Hand den Zipfel der blutenden Aorta, mit der rechten Hand führt man die zum Teil mit Ringerlösung gefüllte und durch einen Finger oben verschlossene Kanüle in den Spalt ein (vgl. Fig. 47).

Fig. 47.



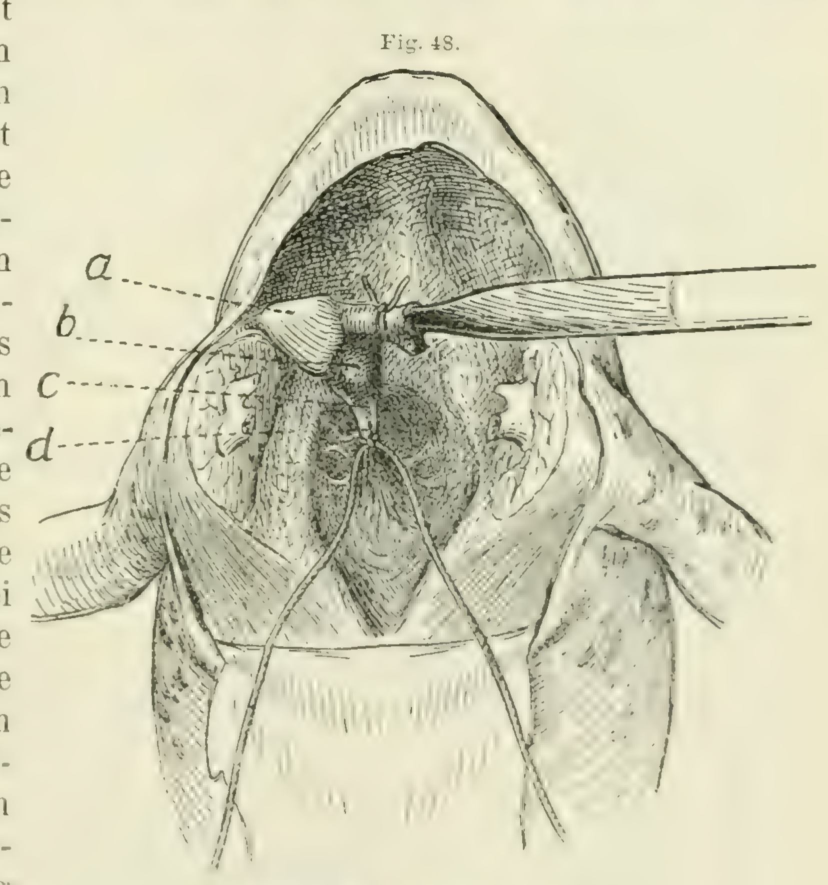
Präparation des Froschherzens. III.

Sobald man mit der Kanüle bis in den Bulbus eingedrungen ist, ist der Verschluß derselben nicht mehr nötig. Man erfaßt nunmehr mit der Pinzette der linken Hand den Herzbeutel an der Stelle der Vereinigung beider Aorten und versucht mit der rechten die Kanüle vom Bulbus in den Ventrikel vorzuschieben (in der Richtung des Pfeiles!). Dies gelingt dem Ungeübten nicht leicht. Man muß hierbei den Widerstand der Herzklappe überwinden. Doch nicht mit Gewalt bohrend, sondern durch vorsichtiges Vor- und Zurückschieben der Kanüle. Man dringt in das Herz leicht und ohne Beschädigung desselben ein im Moment der Systole, d. h. wenn der Ventrikel seinen Inhalt auspreßt und die Klappe geöffnet ist. Man muß suchen, die Kanüle nach hinten und zugleich nach der linken Seite (des Frosches) vorzuschieben. Am besten übt man sich erst an toten Fröschen, bevor man die Isolierung am lebenden Tier versucht.

Das Eindringen der Kanüle in den Ventrikel gelingt mit einem Schlag. Man muß dann darauf achten, daß dieselbe nicht wieder herausgleitet, was beim nunmehr vorzunehmenden Zuziehen der Fadenschlinge um die Aorta

leicht vorkommen kann, namentlich wenn der ausgezogene Teil der Kanüle für das vorliegende Froschherz zu kurz ist. Bevor man die Ligatur fest zuzieht, überzeugt man sich davon, daß die Kanülenspitze tatsächlich in den Ventrikel hineinragt, durch vorsichtiges Betasten des Ventrikels mit einem Finger. Man kann die harte Kanüle durch die Herzwand hindurch leicht fühlen. Über dem ersten Knoten der Ligatur schlingt man einen zweiten, zieht fest an und schneidet die Fäden ab. Das Herz pulsiert an der Kanüle, in welche zum Teil Blut eingedrungen ist, das bei richtiger Lage der Kanüle sich auf und ab bewegt. Man entleert das Blut aus der Kanüle mit einer in dieselbe passenden Pipette (Fig. 51) und ersetzt es durch Ringerlösung. Nach 5—6maliger Blutentnahme und Ersatz durch Ringerlösung gelangt nur noch wenig Blut in die Kanüle aus dem Herzen. Man schneidet dann, indem man die Kanüle hochhebt, zunächst die beiden Aorten ab, dann ein feines Gefäßbändchen, welches von hinten her an den Ventrikel geht, das Frenulum, und endlich die in den Sinus venosus (Fig. 48 *c*) einmündende Hohlvene *(d)*. Hierbei muß man die Kanüle in horizontaler Lage möglichst hoch halten und dann die Vene möglichst tief nach unten abschneiden. Vorzuziehen ist die Anlegung einer zweiten Ligatur um die Hohlvene, bevor man sie abschneidet, da bei länger dauernden Versuchen ein Undichtwerden der anfänglich gut schließenden Vorhofklappen vorkommt. Der Ungeübte läßt sich zur Anlegung dieser Ligatur am besten die Herzkanüle durch einen Assistenten in die Höhe halten, legt erst eine weite Fadenschlinge um die Vorhöfe *(b)* und schiebt diese Schlinge, sie mit zwei Pinzetten allmählich zuziehend, immer mehr nach hinten, so daß der Venensinus möglichst vollständig am Herzpräparat verbleibt. Ist die Ligatur gelegt und mit zweitem Knoten versehen, so werden die Fäden abgetrennt und unter der Ligatur das Gewebe durchschnitten. Bei einiger Übung kann man die Ligatur auch allein anlegen. Zu dem Zwecke spannt man Hohlvenensinus und Hohlvene bei Anlegung der Ligatur mög-

Fig. 48.



Präparation des Froschherzens. IV.

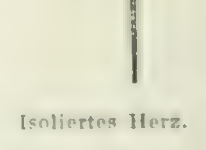
lichst dadurch an, daß man die Kanüle, wie in der Figur ersichtlich ist, quer über die Kehle legt.

Durch wiederholtes Aussaugen mit der Pipette und Einfüllen von Ringerlösung ersetzt man das noch vorhandene Blut durch die Salzlösung, welche bei gelungener Präparation des Herzens, bei der allmählich regelmäßig wiedereinsetzenden Herztätigkeit, in der Kanüle auf und absteigt. Man entfernt die vorhandene Lösung in der Kanüle solange sie noch rötlich gefärbt erscheint, da selbst geringe Blutreste Anlaß zu Gerinnselbildung geben und die Kanüle zum Teil verstopfen können. Bewegt sich bei kräftiger Herztätigkeit die Flüssigkeit in der Kanüle nicht entsprechend mit, so ist die Kanüle in ihrem engen Teile verlegt. Dies kann geschehen durch Blutgerinnsel oder durch Luftblasen, oder dadurch, daß die Kanüle zu tief in dem Ventrikel steckt, so daß die Herzwand das Kanülenende klappenartig verschließt. Luftblasen kann man durch Aussaugen mit der Pipette entfernen, oft auch Blutgerinnsel. Steckt die Kanüle zu tief im Herzen, so sucht man das Herz etwas mehr an der Kanüle herabzuschieben. Ungenügendes Pulsieren in der Kanüle wird natürlich auch dann beobachtet werden, wenn die Kanülenspitze nicht bis in den Ventrikel hineinreicht. Nach Abnahme der ersten Ligatur gelingt es dann noch manchmal, die Kanüle tiefer in den Ventrikel vorzuschieben.

Fig. 49.

Herzkanüle. (Nat. Größe.)

Fig. 50.



Isoliertes Herz.

An der Herzspitze wird nunmehr die aus Federdraht gebogene **Herzklammer** (Fig. 30*a*), die mit einem Faden versehen ist, festgeklemmt. Die Herzklammer muß genügend breite Enden haben, die den Herzmuskel beim Festklemmen nicht verletzen. Kanüle, daneben Kanülenende mit daran festgebundenem Herzen mit Herzklammer sind in Fig. 49 und 50 in natürlicher Größe wiedergegeben. Zur Herstellung der **Herzkanülen** ist hier zu bemerken, daß dieselben am besten in einem Mikrobrenner ausgezogen und mit einer kleinen Verdickung versehen werden, welche aber auch fehlen kann. Nach dem Ausziehen wird das Ende der Kanüle auf feinem Schmirgelpapier schräg abgeschliffen. Um das Abgleiten des Herzens von der Kanüle zu verhindern, wird das Ende derselben mit Glasätztinte etwas rauh gemacht. Die in Fig. 51 verkleinert wiedergegebene **Pipette** wird aus einem weiteren Glasrohr ausgezogen, mit einem Stück Gummischlauch und kleinem Kork versehen. Das kapillare Ende der Pipette wird so lang gelassen, daß beim maximalen Einführen der Pipette in die Herzkanüle das Pipettenende bis in das Kanülenende reicht, aber nicht darüber hinaus, weil sonst das Herz

leicht durchstochen wird. Je weiter die Pipette aber in das Kanülenende vorreicht, desto besser läßt sich mit derselben der Herzinhalt entleeren.

Die Herzkanüle mit dem pulsierenden Herzen wird in dem Kork der Herzkammer (Fig. 52) befestigt, der Faden durch die untere Öffnung der Herzkammer gezogen und durch einen Drahthaken mit dem möglichst entlasteten Schreibhebel verbunden. Sauerstoffzufuhr durch die am Boden der Herzkammer befindliche Ringerlösung erweist sich namentlich am Anfang des Versuches als nützlich, um das Herz in geordnete Tätigkeit zu bringen. Im späteren Verlauf des Versuches kann dieselbe sehr

Fig. 51.

Fig. 52.

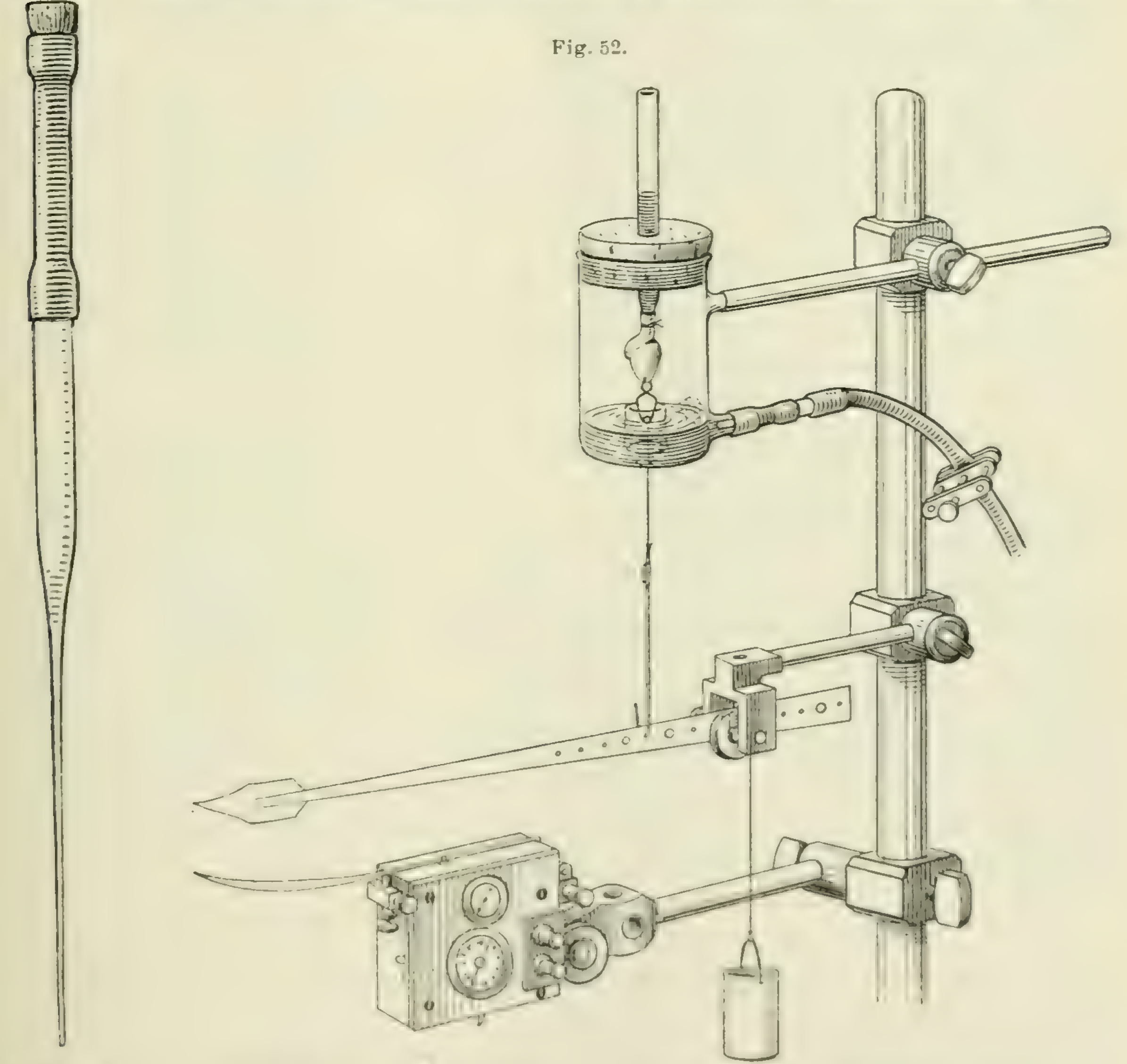


Fig. 51. Pipette für Herzkanüle. (Verkleinert.)

Fig. 52. Isoliertes Froschherz in Herzkammer über Ringerlösung. Sauerstoffdurchleitung. *Jaquet*sche Zeitmarkieruhr.

eingeschränkt werden. Je höher die Außentemperatur bei Anstellung des Versuches ist, desto nötiger erweist sich die Zufuhr von Sauerstoff zum Herzen. Hat die Präparation des Herzens im Sommer längere Zeit in Anspruch genommen, so ist der Herzmuskel erstickt. Hier läßt sich dann eklatant der belebende Einfluß des Sauerstoffs beobachten, den man in diesem Falle so rasch durch die Ringerlösung streichen läßt, daß diese zerstäubt wird und das Herz

besprüht. Ist das Herz nicht wiederzubeleben, so kann dies eventuell daran liegen, daß der Venensinus zu kurz abgebunden ist, wodurch die Herztätigkeit gehemmt wird (Stannius).

Unregelmäßige Herztätigkeit kann mechanisch bedingt sein durch zu weites Hineinragen der Herzkanüle in den Ventrikel. Sie kommt aber auch als pathologische Erscheinung bei kranken Fröschen vor. Solche Herzen sind zu verwerfen. Unbrauchbar ist auch das Herzpräparat zu Vergiftungsversuchen, wenn dasselbe rinnt. Dies kann bedingt sein durch schlechtes Abbinden der Aorta oder der Hohlvene, häufiger aber durch eine Verletzung des Vorhofs bei der Präparation oder durch Verletzung des Ventrikels mit der Herzklammer.

Zur graphischen Registrierung der Herztätigkeit verwendet man einen möglichst entlasteten einarmigen Schreibhebel aus Aluminium oder Stroh. Auch ist darauf zu achten, daß die Schreibfahne eine feine Spitze hat und die auf der berußten Papierfläche zu überwindende Reibung eine geringe (Papier nicht zu dick berußen!) ist.

Das isolierte Froschherz hält sich in feuchter Kammer im winterkalten Raume, selbst ohne Sauerstoffzufuhr, mehrere Tag lang, ebenso im Sommer bei Sauerstoffzufuhr.

1. Der Nachweis von Giften mit Digitalinwirkung.

Wie beim Nachweis von Giften mit Digitalinwirkung am ganzen Frosche erwähnt wurde, ist das Auftreten eines systolischen Herzstillstandes nach Injektion der Giftlösung in einen Lymphsack beweisender für das Vorhandensein eines Produktes mit typischer Digitalinwirkung, als der Versuch am isolierten Herzen. Hier verursachen auch die den Digitalisglykosiden chemisch und pharmakologisch nahestehenden Saponine systolischen Herzstillstand, während sie am ganzen Tier zu schlecht resorbiert werden, um diese Wirkung zu entfalten. Hingegen ist das isolierte Froschherz geeignet, das Vorhandensein noch sehr geringer Mengen von Produkten mit Digitalinwirkung nachzuweisen, welche am ganzen Tier keinen Herzstillstand mehr hervorrufen.

Zu bemerken ist, daß nach *Straub*[1]) für Versuche am isolierten Herzen der Wasserfrosch ebensogut brauchbar ist wie der Grasfrosch, während bei Versuchen am ganzen Tier der Grasfrosch, wegen seiner größeren Empfindlichkeit gegenüber Produkten mit Digitalinwirkung, zur Prüfung derselben vorzuziehen ist.

Injiziert man einem Wasserfrosche (50 *g*) 1—2 cm^3 einer Lösung von Strophanthin *Boehringer* (das annähernd ebenso wirksam ist wie das kristallisierte Produkt von *Merck*) **1 : 10.000** (= **1/10—2/10** ***mg***) in den Brustlymphsack, so geht das Tier im Verlauf eines Tages zugrunde und es zeigt sich bei demselben am freigelegten Herzen systolischer Stillstand.

[1]) *W. Straub*, Quantitative Untersuchungen über den Chemismus der Strophanthinwirkung. Biochem. Zeitschr. Bd. 28. S. 395 (1910)

1 *cm*³ einer Lösung desselben Präparates **1:100.000** (= **1/100** ***mg***) bleibt am ganzen Wasserfrosche ohne sichtbare Wirkung. Am isolierten Herzen des Wasserfrosches hingegen bringt nach *P. Trendelenburg*[1]) die Menge von 1 *cm*³ einer Lösung **1:500.000** (= **2/1000** ***mg***) im Verlauf einer Stunde systolischen Stillstand hervor. Die Substanz muß natürlich in Ringerlösung gelöst sein und wird nach Entleerung des isolierten Herzens von der darin befindlichen Ringerlösung in die Kanüle eingebracht, nachdem erst die normale Herztätigkeit registriert ist. Man markiert auf der Kurve den Zeitpunkt des Einbringens der Lösung.

Charakteristisch für die Hauptvertreter der Produkte mit Digitalinwirkung ist die relativ langsame Wirkung. Der Stillstand tritt auch bei starker Strophanthinlösung niemals sofort auf, sondern erst nach 5 bis 15 Minuten und darüber. Hierdurch unterscheiden sich diese Substanzen mehr oder weniger von den Saponinen, bei welchen in stärkeren Lösungen fast sofortiger systolischer Stillstand des Herzens zustande kommen kann (*P. Trendelenburg*). Auch in noch anderer Weise lassen sich die Saponine von den Digitalissubstanzen unterscheiden. Eine Saponinlösung wird durch Digerieren mit Cholesterin für das Froschherz entgiftet, während dies beim Strophanthin etc. nicht der Fall ist (*Karaúlow*[2]).

Quantitative Anhaltspunkte über die Konzentration einer Lösung an Digitalisprodukten lassen sich nach *Straub*[3]) am isolierten Herzen aus der Form der Gesamtkurve, welche im Verlaufe der Vergiftung aufgezeichnet wird, gewinnen, sofern man sich erst, wie dies *Straub* für das Strophanthin getan hat, an einer Anzahl isolierter Herzen die Wirkungsstufen verschieden starker Lösungen aufgezeichnet hat. Man verwendet hierzu wieder, wie bei der Prüfung am ganzen Frosch angegeben wurde, sehr langsamen Gang des Kymographions, um „Silhouettenkurven" aufzuzeichnen. Wie am ganzen Tier, so fällt auch am isolierten Herzen der Anstieg der Kurve um so steiler aus, je größer die Konzentration der Lösung an wirksamer Substanz ist. Es ist zu erwarten, daß zur quantitativen Bestimmung das ausgeschnittene Herz leistungsfähiger ist als der ganze Frosch, da bei letzterem, wie aus den Versuchen von *Focke* hervorgeht, die Resorptionsgeschwindigkeit nur schwer zu beherrschen ist.

2. Der Nachweis von Aconitin.

Wenn der Versuch am ganzen Frosche (s. d.) die Anwesenheit von Aconitin auch meist einwandfrei durch die Herzwirkung (Peristaltik) erkennen läßt, so sind dazu doch von dem kristallisierten Produkt in Form des salzsauren Salzes Mengen bis **1/100** ***mg*** nötig. Überdies versagt die

[1]) *P. Trendelenburg*, Vergleichende Untersuchung über den Wirkungsmechanismus und die Wirkungsintensität glykosidischer Herzgifte. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakologie. Bd. **61**. S. 256 (1909).

[2]) *Karaúlow*, Über Entgiftung glykosidischer Herzgifte durch Cholesterin in Versuchen am ausgeschnittenen Froschherzen. Biochem. Ztschr. Bd. 32. S. 145 (1911)

[3]) *W. Straub*, l. c.

Reaktion in nicht zu seltenen Fällen vollständig. Hingegen lassen sich am isolierten Herzen noch Mengen von **1/1000** ***mg*** des Salzes mit Sicherheit nachweisen (*Fühner*), was darum besonders wichtig ist, weil für das Aconitin keine empfindlichen und beweisenden chemischen Identitätsreaktionen bekannt sind.

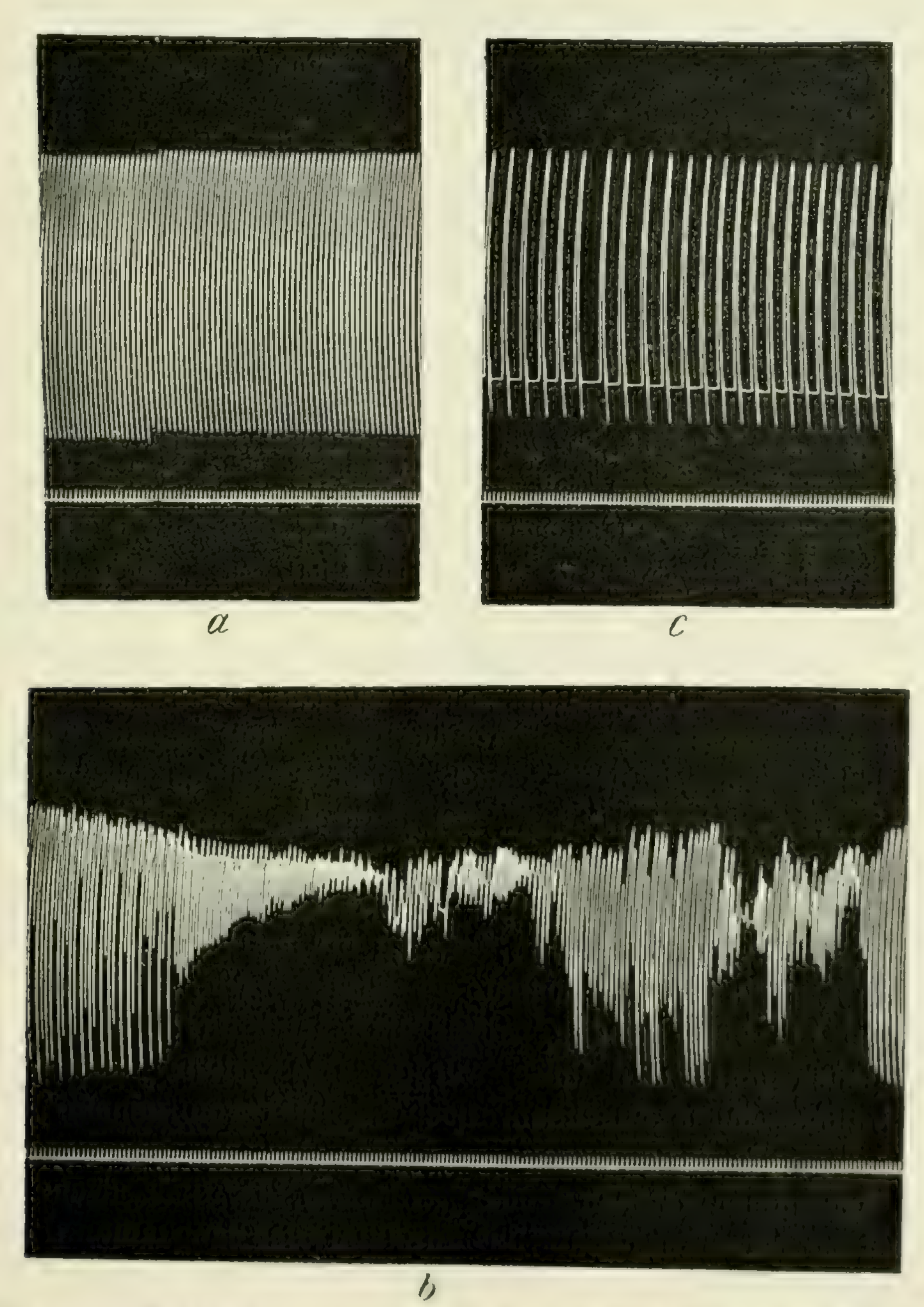
Um eine die charakteristische Peristaltik zeigende Kurve vom isolierten Herzen zu bekommen, wird man in folgender Weise vorgehen:

Man verdünnt das auf Aconitin zu prüfende Material mit Ringerlösung im Verhältnis 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10.000 und 1 : 100.000. Von jeder Verdünnung genügen einige Kubikzentimeter. In das normal pulsierende isolierte Herz eines gesunden Wasserfrosches, das bis dahin mit einem Inhalt von etwa 1/2 cm^3 Ringerlösung gearbeitet hat und von dem man eine Zeitlang die Herztätigkeit aufzeichnete, verbringt man, nach Entleerung der Ringerlösung mit der Pipette, 1/2 cm^3 der auf Aconitin zu prüfenden Flüssigkeit in Verdünnung **1 : 100.000**. Enthält die Lösung im Kubikzentimeter etwa **1/1000** ***mg*** Aconitin, so wird man an dem Herzen folgende Beobachtungen machen können.

Ist die Herzaktion im Anfange des Versuches eine langsame, z. B. bei Kaltfröschen, so wird sie im Verlaufe von etwa 10 Minuten beschleunigt und die anfänglich hohen Pulse werden niedriger. Zweckmäßig saugt man die in der Kanüle enthaltene Lösung im Verlaufe des Versuches etwa alle 10 Minuten mit der Pipette zurück und gibt sie von neuem in das Herz. Man erreicht auf diese Weise bessere Durchmischung der Flüssigkeit. Nach etwa 20 Minuten kann sogenannte Halbierung am Herzen auftreten, d. h. auf zwei Vorhofpulse kommt nur ein Ventrikelpuls, was in der Aufzeichnung auf der berußten Fläche durch seltenere und meist wieder höhere Pulse zum Ausdruck kommt. Es kann dann vorübergehend ein Stadium der Periodenbildung beobachtet werden, wobei auf regelmäßige Serien von 2—6 Pulsen ein Puls ausfällt. Die Herzaktion kann hierauf, bei dieser geringen Giftmenge, wieder eine nahezu normale werden. Ist im Verlaufe einer halben Stunde von Beginn der Vergiftung an keine weitere Wirkung, wie etwa unregelmäßige Herztätigkeit oder die durch fast vollständige vorübergehende Stillstände und auffallend unregelmäßige, abwechselnd große und kleine Pulse im Kardiogramm gekennzeichnete Peristaltik (Fig. 53 *b*) aufgetreten, so entleert man den Herzinhalt und gibt wieder 1/2 cm^3 derselben Verdünnung **1 : 100.000** in das Herz. Ist die Menge von **1/1000** ***mg*** kristallisiertem Aconitin im Kubikzentimeter der Lösung enthalten, so wird sich 20—30 Minuten nach Zugabe der neuen Menge, also jedenfalls im Verlaufe der ersten Stunde der Vergiftung mit ziemlicher Sicherheit Peristaltik einstellen, am Herzen selbst kenntlich durch wurmförmige, hin- und herwogende Bewegungen der Herzmuskulatur. Auf ein Stadium kleiner Pulse folgt meist ein solches mit großen Pulsen. Oder das Herz kommt nach 1—2 Stunden zum völligen diastolischen Stillstand des Ventrikels, während der Vorhof noch eine Zeitlang weiter pulsiert. Dieser Stillstand läßt sich beseitigen. Man entleert dazu den Herz-

inhalt und ersetzt ihn durch Ringerlösung. Durch wiederholtes Ansaugen und Zurückpressen der Ringerlösung in den Ventrikel mit der Pipette wird das Herz rhythmisch gedehnt und allmählich nimmt es wieder seine geordnete Tätigkeit auf. Die Pulse werden nach und nach größer, aber die

Fig. 53.



Rana esculenta. 86 *g*. Männlich. Isoliertes Herz. Vergiftung durch Aconitin. cristall. HCl 1 : 100.000. *a* normale Herztätigkeit. *b* Peristaltik. *c* finale Pulsverlangsamung. Zeit = Sekunden.

Herzaktion ist gegenüber früher stark verlangsamt. Man kann den Herzinhalt noch 1—2mal entleeren und durch Ringerlösung ersetzen. Mehrere Stunden nach der Vergiftung ist die Herztätigkeit wieder vollkommen regelmäßig. Aber der Ventrikel pulsiert langsam bei normaler Vorhoftätigkeit (Fig. 53 *c*). 8—16 Vorhofpulse können auf eine Ventrikelkontraktion

kommen. Dieses ist das letzte charakteristische Stadium der Aconitinwirkung am Froschherzen, das man aber bei so kleinen Giftmengen nicht immer erhält. Unter den angegebenen Bedingungen kann das mit Ringerlösung pulsierende Herz von kleinen wirksamen Aconitinmengen sich wieder völlig erholen.

Hat die zu prüfende Lösung im Verlaufe einer Stunde keine Peristaltik und keinen diastolischen Herzstillstand hervorgerufen, so entfernt man sie aus dem Herzen und prüft die nächst höhere Konzentration (**1 : 10.000**) in der angegebenen Weise.

Es kommt, wenn auch selten, vor, daß diastolischer Stillstand des Herzens im Verlauf der ersten Stunde der Einwirkung von schwachen Aconitinlösungen eintritt ohne voraufgehende deutliche Peristaltik. Man wird dann das Herz in der oben angegebenen Weise mit Ringerlösung behandeln, nach Entleerung der Giftlösung. In solchen Fällen kann Peristaltik beim Auswaschen eintreten. Geht aber auch hier die Herzaktion ohne Peristaltik und Pulsverlangsamung in normale Herztätigkeit über, so gibt man von neuem die erste Giftlösung zu. Es kann jetzt immer noch Peristaltik auftreten. Ist dies nicht der Fall, so entfernt man die Lösung und prüft das ausgewaschene Herz auf normale Reaktionsfähigkeit durch Einbringen einer Lösung von salzsaurem Aconitin **1 : 100.000**. Zeigt durch diese Lösung das Herz im Verlauf der ersten halben Stunde deutlich ausgeprägte Peristaltik, so ist es unwahrscheinlich, daß die erste zu prüfende Lösung Aconitin enthielt oder sie enthielt neben Aconitin Verunreinigungen, welche das Zustandekommen der typischen Aconitinwirkung verhindern.

Die beigegebenen Kurven sind einem Versuche entnommen, bei welchem das Herz eines großen Wasserfrosches mit einer Lösung von Aconitin HCl **1 : 100.000** (d. h. **1/100** *mg* im Kubikzentimeter) vergiftet wurde. Nach Einbringung des ersten $^1/_2$ *cm*³ der Lösung zeigte das Herz, dessen normale Tätigkeit aus Fig. 53*a* zu ersehen ist, schon nach 5 Minuten die in Fig. 53*b* aufgezeichnete Peristaltik. Nachdem diese vorüber war, wurden die Pulse wieder größer und langsamer. Die in Fig. 53*c* wiedergegebenen langsamen Pulse wurden eine Stunde nach Beginn der Vergiftung aufgezeichnet, nachdem noch dreimal von neuem $^1/_2$ *cm*³ der Lösung 1 : 100000 in das Herz gegeben worden war. Auf dieses Stadium folgt schließlich, bei immer seltener werdenden Pulsen, der diastolische Stillstand.

Es ist zu bemerken, daß das Stadium der langsamen Pulse selbst bei der Konzentration der Aconitinlösung **1 : 10.000** (**1/10** *mg* im Kubikzentimeter) fast nie vor $^1/_2$–$^3/_4$ Stunden eintritt. Bei dieser starken Aconitinlösung ist die Peristaltik schlecht ausgeprägt. Deshalb ist es bei Prüfung einer unbekannten Lösung angebracht, erst mit weitgehenden Verdünnungen zu beginnen. Optimale lang andauernde Peristaltik erhält man bei Lösungen des kristallisierten Aconitins in Konzentration **1 : 200.000** bis **1 : 500.000**, wobei die Menge von $^1/_2$ *cm*³ meist ausreicht.

Ganz denselben Verlauf der Vergiftung kann man mit amorphem salzsauren Aconitin (*Merck*) bekommen, nur ist dasselbe schwächer

wirksam als das kristallisierte Produkt. Auch mit einer durch Ringerlösung verdünnten Tinct. Aconiti lassen sich die gleichen Erscheinungen erhalten. Bei der Tinktur namentlich wird öfters erst beim Auswaschen des vergifteten Herzens mit Ringerlösung die Peristaltik in typischer Weise beobachtet.

Unter den angegebenen Bedingungen dürfte es an jedem normalen Froschherzen (Wasserfrosch; Grasfrösche sind in dieser Richtung bisher nicht geprüft!) gelingen, geringste Aconitinmengen nachzuweisen.

3. Der Nachweis von Muscarin.

Wie Digitalisprodukte und Aconitin ist auch das Muscarin in geringerer Menge am isolierten Herzen nachzuweisen als am ganzen Frosche.

Bemerkenswert bei der Muscarinwirkung ist vor allem, wie schon bei der Besprechung des Giftes in seiner Wirkung am ganzen Tiere (s. d.) hervorgehoben wurde, die wechselnde Resistenz der Frösche ihr gegenüber. Diese findet sich nicht nur am ganzen Tiere ausgeprägt, etwa abhängig von verschiedener Resorptionsgeschwindigkeit von den Lymphsäcken aus, sondern auch am isolierten Herzen.

Bei Verwendung von künstlichem, durch Oxydation von Cholin hergestelltem salzsauren Muscarin in Ringerlösung gelöst, ist am isolierten Herzen von empfindlichen Wasserfröschen durch eine Lösung **1 : 100.000** (in Menge von $^1/_2$ cm^3 in die Herzkanüle gebracht) noch deutliche Verminderung der Pulshöhe und durch Lösung **1 : 50.000—1 : 75.000** noch diastolischer Stillstand zu erzeugen. An unempfindlichen Herzen wird der Stillstand oft erst durch Lösungen **1 : 10.000**, manchmal nur durch **1 : 5000** hervorgerufen (*Fühner* und *Rosenow*[1]).

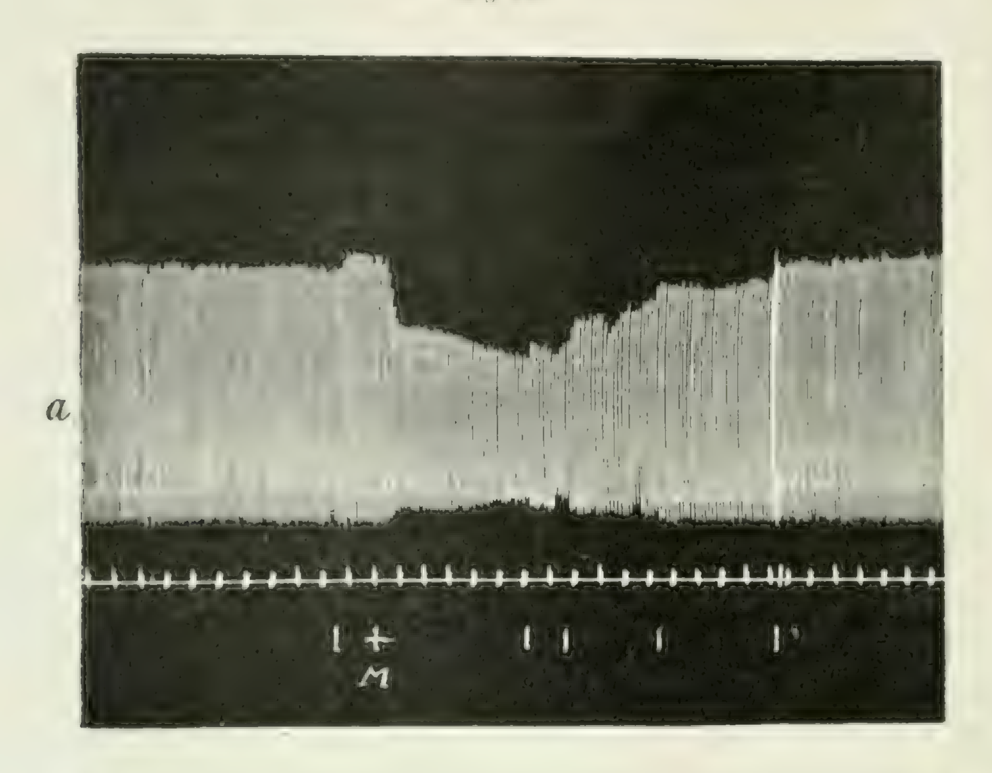
Fig. 54 *a* zeigt die Wirkung von $^1/_2$ cm^3 einer Lösung von salzsaurem Muscarin **1 : 50.000** an einem wenig empfindlichen Froschherzen. Beim Entfernen der Ringerlösung aus dem Herzen steigt die Höhe der Herzpulse etwas an. Sie nehmen aber sofort nach Einbringen der Muscarinlösung stark ab. Diese Verringerung der Pulshöhe („negativ-inotrope Wirkung“) ist die einzige Wirkung dieser Lösung. Nach Entfernung der Giftlösung und Ersatz durch Ringerlösung steigen die Pulse wieder an und bei wiederholtem Auswaschen kehrt die Herztätigkeit bald zur Norm zurück.

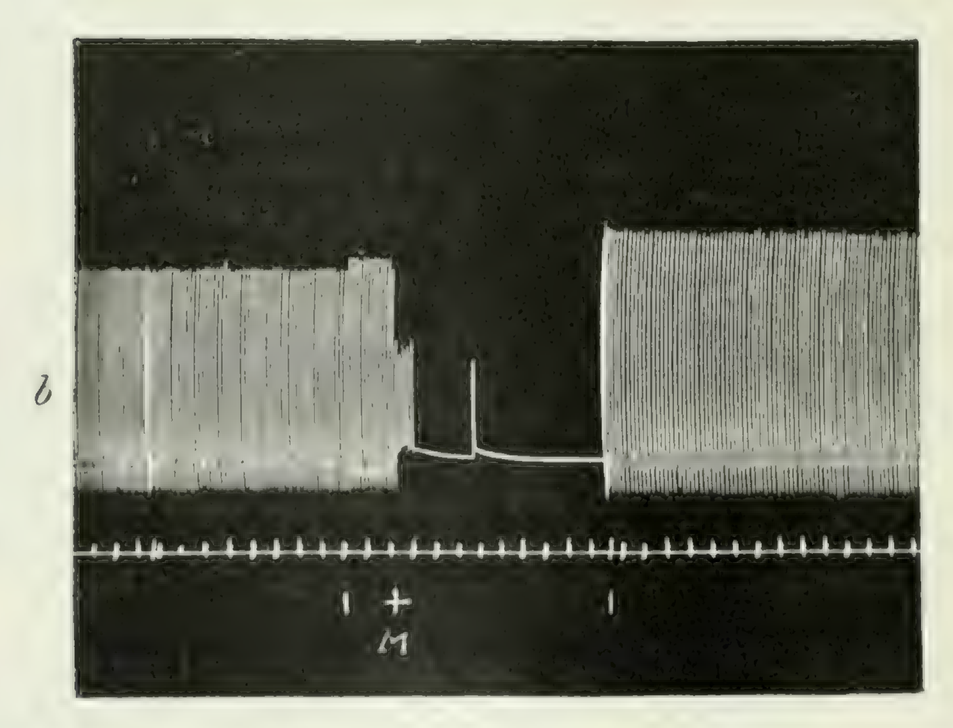
Fig. 54 *b* zeigt die Wirkung einer Muscarinlösung **1 : 10.000** an demselben Herzen. Nachdem die Pulse kleiner geworden sind, tritt rasch diastolischer Stillstand auf, nur noch einmal unterbrochen durch eine Ventrikelkontraktion. Dem vollständigen Stillstand kann eine Serie verlangsamter Pulse („negativ-chronotrope Wirkung“) vorausgehen, wie z. B. in

[1]) *H. Fühner* (und *E. Rosenow*), Über das Verhalten des synthetischen Muscarins im Tierkörper. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 61. S. 284 (1909).

Fig. 55. Dieser diastolische Herzstillstand läßt sich durch gründliches und häufig wiederholtes Auswaschen mit Ringerlösung vollständig beseitigen.

Fig. 54.





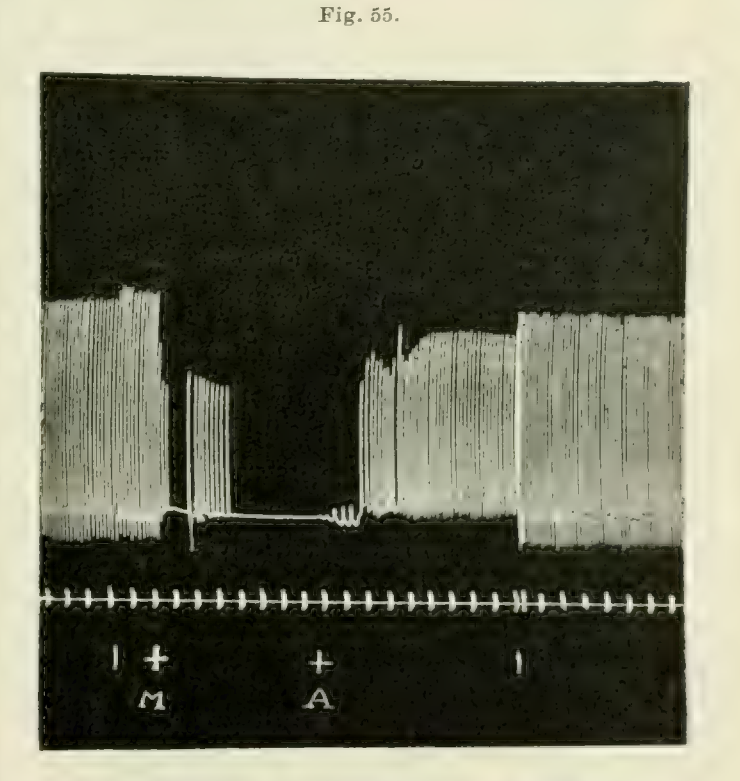
Rana esculenta. 55 g. Männlich. Isoliertes Herz. *a* Vergiftung durch Muscarin HCl 1 : 50.000 (bei *M*). *b* Vergiftung durch Muscarin HCl 1 : 10.000 (bei *M*). Bei (|) Ringerlösung entleert oder Herz ausgewaschen. Zeit = 10 Sekunden.

Am längsten dauert es, bis auch der Vorhof wieder normal pulsiert, der durch das Muscarin im Gegensatz zum Aconitin und den Substanzen mit Digitaliswirkung früher in seiner Tätigkeit beeinträchtigt wird als der Ven-

trikel. Erst wenn die Vorhofpulse wieder kräftig und normal erfolgen, ist das Muscarin völlig aus dem Herzen ausgewaschen, was nach stärkerer Vergiftung etwa 20 Minuten in Anspruch nimmt. Das Herz reagiert dann, einer neuen Muscarinvergiftung gegenüber, wieder wie ein normales Herz. Man kann an demselben Herzen bis zu 20 Muscarinvergiftungen verschiedener Grade vornehmen, ein Umstand, welcher die genaue quantitative Bestimmung des Muscarins, und zwar nicht nur des synthetischen, sondern auch des natürlichen Produktes, am isolierten Froschherzen ermöglicht (*Fühner*[1]).

Dieselben Wirkungen, wie sie hier beschrieben sind, lassen sich am isolierten Herzen auch durch Lösungen von Kaliumchlorid hervorbringen. Doch unterscheidet sich der diastolische Stillstand durch eine Kalilösung prinzipiell vom Muscarinstillstand dadurch, daß er durch Atropin nicht beseitigt werden kann.

Fig. 55.



Rana esculenta. 55 *g*. Männlich. Isoliertes Herz. Vergiftung durch Muscarin (*M*). Stillstand beseitigt durch Atropinzugabe (*A*). Bei (|) Ringerlösung entfernt oder Herz ausgewaschen. Zeit = 10 Sekunden.

Fig. 55 zeigt Muscarinstillstand wieder an demselben Herzen wie oben und durch dieselbe Lösung **1 : 10.000.** Während des Stillstandes wurde zu der Muscarinlösung in der Herzkanüle etwas einer schwachen Lösung von Atropinsulfat zugesetzt und der Kanüleninhalt durch leichtes Ansaugen durchmischt. Bald schon traten schwache, allmählich stärker werdende Pulse auf und nach einiger Zeit war die Herztätigkeit wieder eine normale. Das Atropin läßt sich durch Auswaschen aus dem Herzen nicht mehr derart beseitigen, daß das Muscarin von neuem wirksam wird. Noch geringste Spuren von Atropin hindern das Zustandekommen des Muscarinstillstandes. Nach *Harnack*[2]) genügt schon am ganzen Frosch die Menge von **1/400 *mg*** Atropin, um die Muscarinwirkung aufzuheben. Die am isolierten Herzen wirksamen Atropinmengen dürften noch bedeutend geringere sein und ist hiermit zugleich eine Methode zum Nachweis kleiner Atropinmengen gegeben.

---

[1]) *H. Fühner*, Die quantitative Bestimmung des synthetischen Muscarins auf physiologischem Wege. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **59**. S. 179 (1908).

[2]) *E. Harnack*, Über die Wirkung des Atropin und Physostigmin auf Pupille und Herz. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **2**. S. 331 (1874). — Noch wirksamer in

d) Prüfungen am Gefäßpräparat.

Wertbestimmung von Nebennierenpräparaten und Adrenalinlösungen.

Zur Prüfung der Wirkung von Substanzen, welche wie das Adrenalin (Suprarenin) die Gefäßweite beeinflussen, findet nach einem Vorschlage von *Straub* ein Gefäßpräparat des Frosches Verwendung, welches nach *A. Läwen*[1]) und *P. Trendelenburg*[2]) in folgender Weise hergestellt wird.

Einem möglichst großen Wasserfrosche (100 *g* und darüber) wird der Kopf abgeschnitten und das Rückenmark sorgfältig ausgebohrt.

Der Frosch wird, auf einem Teller auf dem Rücken liegend, mit dem Kopfe nach dem Präparierenden gewendet. Mit Schere und Pinzette wird die Haut in etwa 2 *cm* breitem Lappen von der Brust bis in die Schenkelgegend abpräpariert und über die Oberschenkel gelegt (Fig. 56). Hierauf folgt die Entfernung des Brustbeins, das von den Oberarmknochen abgeschnitten und in die Höhe gehalten wird. Man sieht an seinem unteren Ende, von der vorderen Bauchwand zum Herzen ziehend, genau in der Mittellinie, die große Bauchvene, welche man durch einen Scherenschnitt abtrennt. Dann wird die Bauchdecke unterhalb des Brustbeins quer durchschnitten, ein Lappen von 2 *cm* Breite (je 1 *cm* zu beiden Seiten der Vene) nach unten zu präpariert und über den Hautlappen gelegt. Nunmehr wird der Teller umgedreht. Man präpariert die Blase des Frosches vorsichtig (unter Schonung der Bauchvene) und möglichst tief nach unten von der vorderen Bauchwand ab und schneidet sie zusammen mit dem Mastdarm heraus. Eine Ligatur um Mastdarm und Blase, wie sie die Abbildung (Fig. 56 *e*) zeigt, ist überflüssig. Hingegen müssen beiderseits die von den Schenkelvenen aufwärts zur Nierengegend ziehenden Venae renales advehentes mit feiner Pinzette unterstochen und mit Ligaturen *(d)* abgebunden werden. Nun werden unter Schonung der schwarz aussehenden über der Wirbelsäule herabziehenden Aorta *(a)* sämtliche Bauchorgane entfernt, bis herauf zum Herzen, welches gleichfalls entfernt oder mit der Aorta in Verbindung gelassen wird. Der Frosch wird auf das Froschbrett horizontal gelagert und kann an den Armen mit zwei Klammern fixiert werden. Darauf wird eine möglichst fein ausgezogene Kanüle *(AoK)* in die Aorta etwa 1 *cm* oberhalb ihrer Gabelung über der Wirbelsäule durch eine mit einem Scheren-

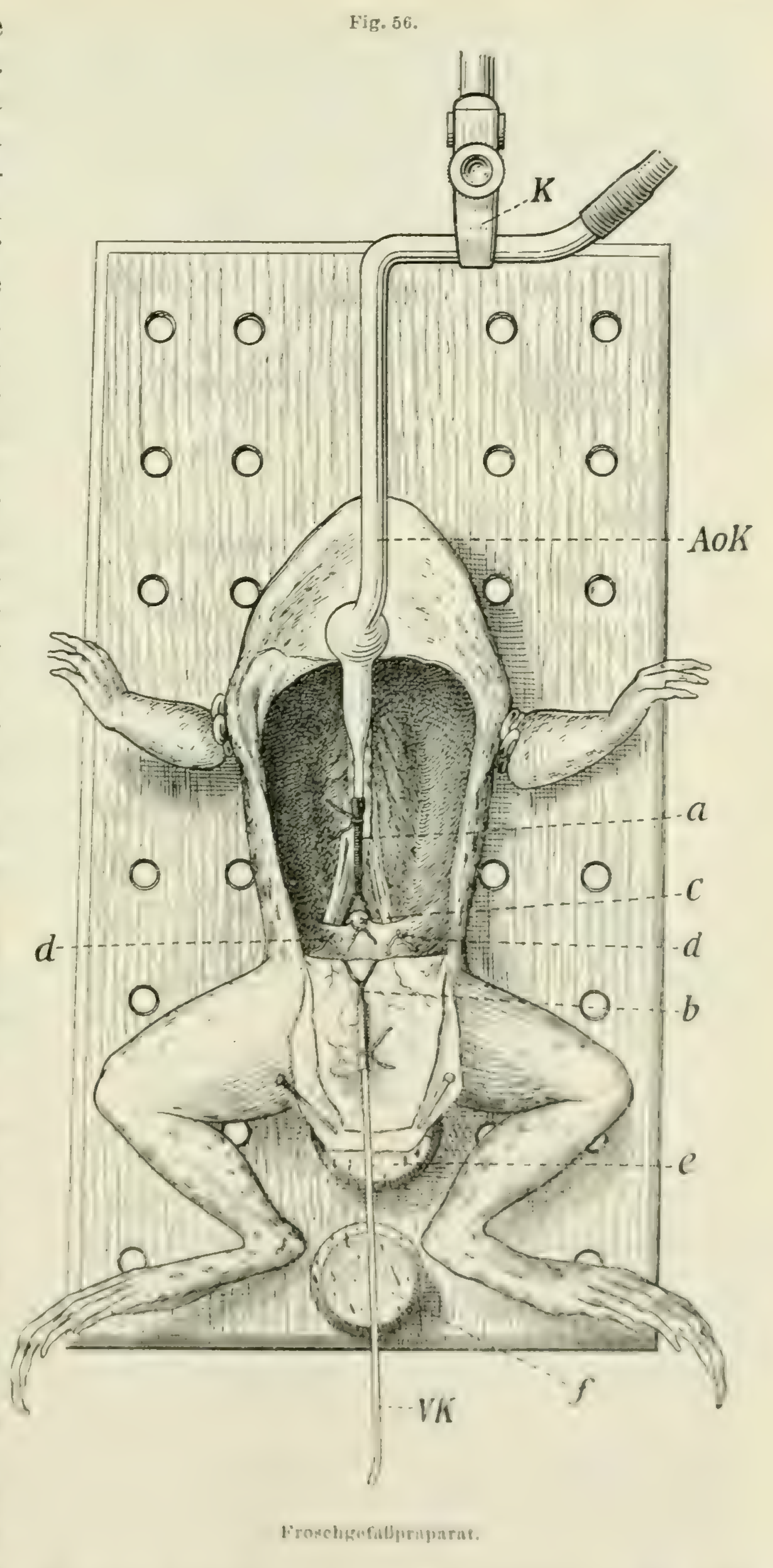
dieser Richtung als das Atropin ist nach *E. Harnack* und *H. Meyer* [Untersuchungen über die Jaborandialkaloide. Ibid. Bd. **12**. S. 369 (Anmerk.) (1880)] das dem Atropin nahestehende Duboisin.

[1]) *A. Läwen*, Quantitative Untersuchungen über die Gefäßwirkung von Suprarenin. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **51**. S. 415 (1904).

[2]) *P. Trendelenburg*, Bestimmung des Adrenalingehaltes im normalen Blut sowie beim Abklingen der Wirkung einer einmaligen intravenösen Adrenalininjektion mittelst physiologischer Meßmethode. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **63**. S. 161 (1910).

schnitte hergestellte Öffnung eingeführt. Die Kanüle wird, etwa 6 *cm* lang, aus einem dickwandigen Kapillarrohr ausgezogen (die in der Figur gezeichnete längere Kanüle ist unnötig). Die Kanüle wird in die Aorta, unter welche vorher ein Faden gelegt wurde, bis dicht oberhalb der Gabelung derselben vorgeschoben, festgebunden und mit einer Klammer am Stativ in richtiger Lage befestigt. Zur Einbindung ist die Kanüle schon mit Ringerlösung gefüllt von einer *Mariotte*schen Flasche (250 cm^3) aus, welche durch einen etwa 40 *cm* langen Gummischlauch mit der Kanüle verbunden ist. Der Gummischlauch wird mit einem Quetschhahn versehen, der während der Einführung der Kanüle in die Aorta soweit geöffnet ist, daß die Ringerlösung langsam aus der Kanüle tropft. Gummischlauch und Kanüle müssen frei von Luftblasen sein. Luftblasen, in die Gefäße gelangt, können diese verstopfen (Luftembolie) und das Präparat unbrauchbar machen. Sitzt die Aortenkanüle richtig, so fließt bei geöff-

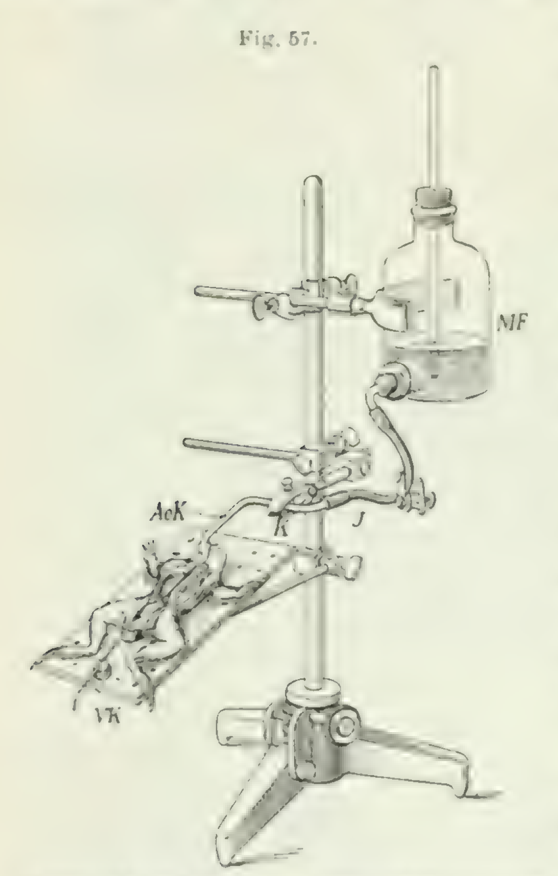
Fig. 56.



Froschgefäßpräparat.

netem Quetschhahn schon Flüssigkeit durch die hintere Extremität und aus der Bauchvene *(b)*, in welche jetzt die Venenkanüle *(VK)* eingeführt wird. Man lagert hierzu zweckmäßig den Haut- und Muskellappen auf einen Kork *(e)*, auf welchem er mit Nadeln angeheftet werden kann. Durch eine mit der Schere hergestellte Schnittöffnung wird die Kanüle in das Gefäß geschoben. Die Venenkanüle muß dünnwandig und innen möglichst weit sein. Man zieht sie am besten aus einem Reagenzglase in Länge von 10—12 *cm* aus. Sie kann an der Einführungsstelle einen äußeren Durchmesser von 1 *mm*, an der umgebogenen Ausflußstelle einen solchen von 2 *mm* haben. Ein Festbinden der Kanüle in der Bauchvene ist überflüssig. Zur Unterstützung der Venenkanüle, welche derart gelagert werden muß, daß das Gefäß keine Knickung erleidet, dient ein zweiter Kork *(f)*. — Die *Mariotte*sche Flasche (Fig. 57 *MF*), durch deren Heben und Senken die Ausflußgeschwindigkeit der Tropfen aus der Venenkanüle reguliert werden kann, wird so eingestellt, daß in der Minute 30—40 Tropfen ausfließen. Dazu genügt am Anfang des Versuches eine Einstellung der Flasche 10—15 *cm* über dem Präparat.

Fig. 57.



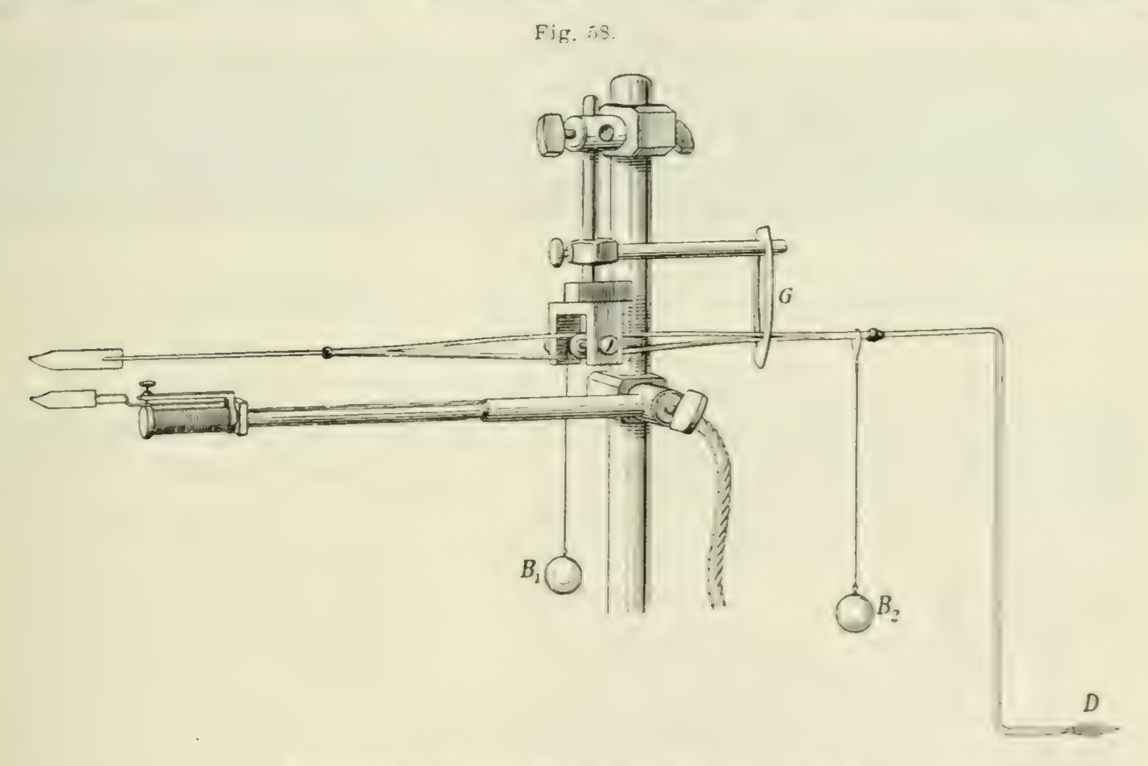
Gefäßpräparat mit Durchströmungsvorrichtung.

Die zu prüfende Flüssigkeit wird jeweils in Menge von 1 cm^3 mit einer mit feiner Nadel versehenen Spritze in das Innere des Gummischlauches eingespritzt. Dies geschieht nahe der Ansatzstelle des Gummischlauches an die Aortenkanüle (Stelle *J*). Letztere muß so fest durch die Klammer (Fig. 56 u. 57 *K*) am Stativ gehalten werden, daß eine Verschiebung während der Injektion nicht vorkommt. Die Flüssigkeit wird langsam eingespritzt (Dauer etwa 15 Sekunden), wobei man darauf achtet, daß während der Injektion in dem Glasrohr der *Mariotte*schen Flasche die Ringerlösung jedesmal gleichhoch (etwa 1 *cm*) steigt, der Druck in dem Apparat also jedesmal in gleicher Weise gesteigert wird. Ein Größerwerden der Tropfenzahl ist bei dieser geringen Drucksteigerung kaum wahrzunehmen.

Die Zahl der fallenden Tropfen wird graphisch registriert. Zu solchem Zwecke existieren verschiedene elektrische Registrierapparate, die aber alle ab und zu versagen. Als viel brauchbarer und niemals versagend hat sich eine von Herrn Prof. *Straub* angegebene Vorrichtung erwiesen, die man sich leicht selbst herstellen kann (Fig. 58). Es wird dazu ein 20 *cm* langer Strohhalm (vgl. die Angabe S. 36) aufgespalten und an der Achse eines Schreibhebelwinkels in der Mitte seiner Länge fixiert. An seinem vorderen

Ende wird mit Siegellack ein etwa 10 *cm* herausragender dünnerer Strohhalm eingekittet, welcher die Papierfahne zur Aufzeichnung auf der berußten Trommel trägt. In das zweite Ende wird ein doppelt rechtwinkelig gebogenes Glasröhrchen (Fig. 58) eingekittet, an dessen freiem Ende ein „Deckglas" *(D)* aufgeschmolzen ist. Dieser Arm des Schreibhebels wird durch einen in der Mitte mit einem 4 *cm* langen Schlitz versehenen Gummistreifen *(G)* federnd getragen, welcher seinerseits oben von einem Stativstück gehalten wird. Zur Anspannung des Gummistreifens ist an dem Hebelarm, verstellbar, ein kleines Gewicht *(B_2)* angebracht. Ein zweites Gegengewicht *(B_1)* kann an der Achse des Schreibhebels angehängt werden. Die Gewichtsstellung wird nach den Ausschlägen, die der Schreibhebel auf der berußten Trommel gibt, reguliert. Man stellt das Froschbrett so hoch

Fig. 58.



Schreibhebel zur Tropfenregistrierung nach ***Straub.***

ein, daß die Tropfen aus einer Höhe von 10—20 *cm* auf das Deckglas des Schreibhebels und von da in eine Glasschale fallen.

Über der Kurve, welche der Schreibhebel auf dem Kymographion verzeichnet, wird durch einen Markiermagneten die Zeit in Minuten aufgenommen. Nach Abschluß des Versuches wird auf den lackierten Kurven ausgezählt, wie viele Tropfen in der Minute auf den Schreibhebel fielen.

Injiziert man Adrenalinlösungen in angegebener Weise in den Gummischlauch, so erfolgt durch Verengerung der Gefäße sehr rasch eine Verminderung der Zahl der Tropfen, welche aus der Venenkanüle ausfließen. Fig. 59 zeigt zwei Kurven, welche nacheinander an demselben Präparate nach Einspritzung verschieden starker Adrenalinlösungen aufgenommen wurden. Die injizierten Adrenalinlösungen hatten die Konzentration **1 : 10 Millionen** (Kurve *a*) und **1 : 5 Millionen** (Kurve *b*). Diese Injektionen wurden an einem

Froschpräparate bald nach seiner Herstellung vorgenommen. Es muß bemerkt werden, daß nach *P. Trendelenburg* die Empfindlichkeit des Präparates anfangs eine viel geringere ist als später, nachdem erst einige Stunden lang Ringerlösung durch dasselbe geleitet wurde, eine Erscheinung, welche an die allmählich zunehmende Empfindlichkeit des isolierten

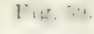
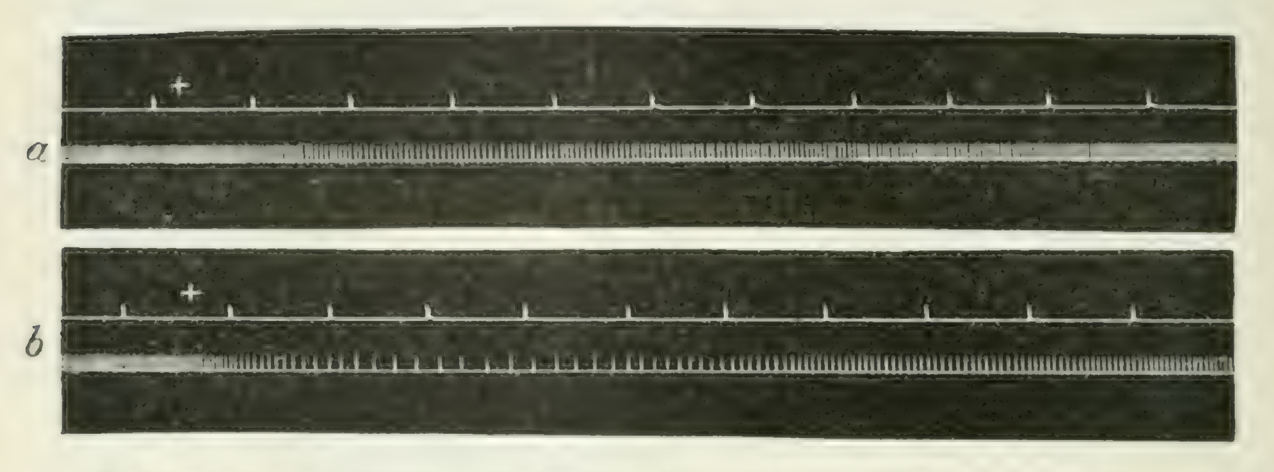


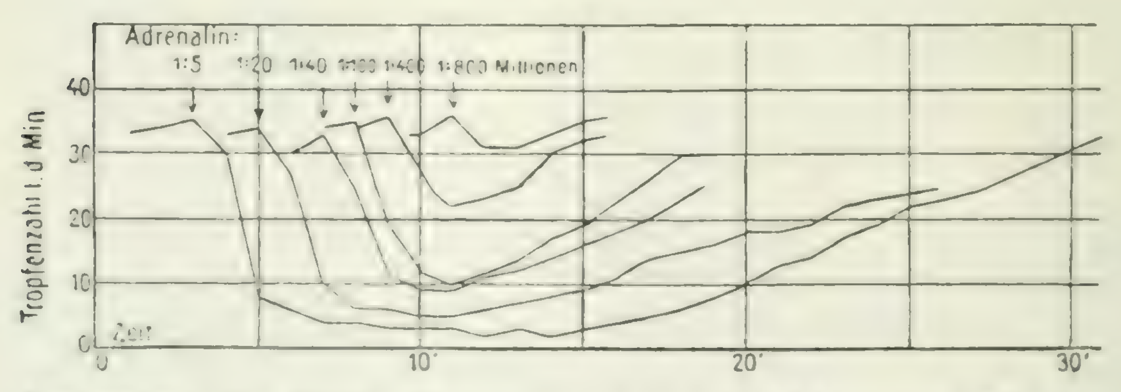
Fig. 59.



Rana esculenta. 85 *g*. Weiblich. Gefäßpräparat. Bei (+) Adrenalininjektion. *a* 1 : 10 Millionen 1 cm^3. *b* 1 : 5 Millionen 1 cm^3. Oben Zeit in Minuten. Unten Tropfenregistrierung.

Froschherzens gegenüber dem Muscarin erinnert. Empfindliche Froschpräparate geben noch mit Adrenalinlösungen **1 : 100 Millionen** regelmäßig deutliche Ausschläge. Die Abnahme der Tropfenzahl ist der Adrenalinkonzentration proportional, wie die in Fig. 60 wiedergegebenen an

Fig. 60.



Rana esculenta. 125 *g*. Weiblich. Die Injektionen fanden bei ↓ in der angegebenen Reihenfolge von 1 : 5 Mill. absteigend statt, sobald das Präparat sich wieder von der vorangehenden Injektion erholt hatte und die Tropfenzahl wieder auf 33—35 in der Minute angestiegen war. Dauer der Versuche 1¾ Stunden. (Nach *P. Trendelenbu*[illegible])

einem ungewöhnlich empfindlichen Präparate aufgenommenen Kurven zeigen. Auch von Anfang an zeigt sich eine verschiedene Empfindlichkeit der Versuchsfrösche, so daß jedes Präparat erst geaicht werden muß.

Bei der Gehaltsbestimmung von Nebennierenpräparaten oder der Dosierung von Adrenalinlösungen sind folgende Punkte zu beachten.

Nach Herstellung des Präparates und Einstellung der Tropfenzahl auf 30—40 pro Minute wird eine Probeinjektion einer frisch hergestellten Adrenalinlösung (L. Suprarenin. hydrochloric. synthet. Hoechst) 1 : 10 Millionen gemacht. Ist das Präparat empfindlich, so wird man von Anfang an schon einen starken Ausschlag, etwa wie oben bei 1 : 5 Millionen bekommen. Nachdem die Wirkung dieser ersten Injektion abgeklungen ist, was man durch vorübergehende Druckerhöhung beschleunigen kann, injiziert man 1 cm^3 der zu prüfenden Flüssigkeit, von welcher man erst weitgehende Verdünnungen mit Ringerlösung hergestellt hat. Ist die erst injizierte Probe unwirksam, so geht man zu geringeren Verdünnungen des Untersuchungsmaterials über, bis man zu einem Wirkungsgrade von obiger Lösung 1 : 10 Millionen gelangt ist. Im Anschluß an die Injektion einer so wirksamen Probe wird man von neuem die Testlösung prüfen, um zu kontrollieren, ob das Präparat noch die ursprüngliche Empfindlichkeit beibehalten hat.

Nach Verlauf von mehreren Stunden schwellen die Froschextremitäten stark an (Ödembildung), was aber die weitere Verwendung des Präparates durchaus nicht beeinträchtigt. Dasselbe kann selbst mehrere Tage hindurch Verwendung finden, wenn es vor dem Vertrocknen bei Nichtgebrauch durch Bedecken mit nasser Watte geschützt und in niederer Temperatur (Eisschrank) gehalten wird.

Von allen biologischen Methoden zur Gehaltsbestimmung von Adrenalinlösungen ist die hier beschriebene die empfindlichste. Eine andere Methode ist beim Froschauge (s. d.) beschrieben. Adrenalindosierung ist nach *Batelli* u. a. möglich durch Blutdruckversuche an höheren Wirbeltieren. Ferner sind zu dem Zwecke der isolierte Kaninchenuterus (*Fränkel*[1]) und Rinderarterien (*O. B. Meyer*[2]) benutzt worden. Zur Kritik dieser Methoden vgl. *P. Trendelenburg*[3]) und *E. Bröking* und *P. Trendelenburg*.[4])

e) Prüfungen am Auge.

Eine größere Anzahl von Giften besitzt die Eigenschaft, bei lokaler Applikation auf das Auge die Pupille zu erweitern oder zu verengern, manche, wie das Atropin, in so hohem Maße, daß noch kleinste Mengen

[1]) *A. Fränkel*, Über den Gehalt des Blutes an Adrenalin bei chronischer Nephritis und Morbus Basedowii. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **60**. S. 395 (1909).

[2]) *O. B. Meyer*, Über einige Eigenschaften der Gefäßmuskulatur mit besonderer Berücksichtigung der Adrenalinwirkung. Dissertat. Würzburg 1906.

[3]) *P. Trendelenburg*, l. c.

[4]) *E. Bröking* und *P. Trendelenburg*, Über den Adrenalinnachweis und den Adrenalingehalt im menschlichen Blute. Deutsches Arch. f. klin. Medizin (1911). — Eine Zusammenstellung der gesamten bis heute vorliegenden Literatur über das Adrenalin findet sich in der Abhandlung von *G. Bayer*. Die normale und pathologische Physiologie des chromaffinen Gewebes der Nebennieren. *Lubarsch-Ostertags* Ergebnisse der pathologischen Anatomie. Jahrg. 14 (1910).

derselben angezeigt werden. Zum Nachweis dient aber in der Praxis nicht das Auge des Frosches hierfür, sondern das viel empfindlichere Auge der Katze oder noch besser, speziell für Atropin und ihm verwandte Gifte, dasjenige des Menschen (s. d.).

Pupillenerweiterung (Mydriasis) auch am Froschauge bewirken neben Atropin die diesem nahestehenden Alkaloide Homatropin, Scopolamin, Duboisin, Tropacocain, Cocain, dann vor allem auch das Adrenalin (Suprarenin).

Pupillenverengerung (Miosis) wird hervorgerufen durch Physostigmin, Muscarin, Nicotin, Pilocarpin.

In der Pupillenwirkung dieser Substanzen bestehen zum Teil Unterschiede: Legt man ein isoliertes Froschauge, welches erst im Dunkeln gehalten wurde und dessen Pupille dabei weit geworden ist, in eine 1%ige Lösung von Pilocarpin- oder Physostigminsalz, so verengert sich die Pupille. Bringt man ein Froschauge erst in 1/2%ige Atropinlösung, so wird es hier weit. Nach der Atropinwirkung erweist sich nur noch das Physostigmin als wirksam, Pilokarpin nicht mehr. Legt man hingegen ein Auge erst in Curarin (oder Curare), so hat zwar noch das Pilocarpin verengende Wirkung, aber nicht mehr das Physostigmin.[1]) Zur toxikologischen Charakterisierung von Pilocarpin und Physostigmin dürfte die Reaktion nicht empfindlich genug sein.

Die hauptsächliche Verwendung, welche das enukleierte Froschauge gefunden hat, ist diejenige zur quantitativen Bestimmung des Adrenalins (*Ehrmann*[2])).

Herstellung des Präparates. Man geht mit starker Schere in das Maul eines Frosches (Wasser- oder Grasfrosch) ein und schneidet mit einem Schlage den die Augen enthaltenden Kopfteil möglichst weit nach hinten ab. Der Kopf wird in der Mittellinie halbiert. Mit Schere und Pinzette lassen sich die Augen nach Abtrennung der Kopfhaut leicht und ohne Verletzung (ohne daß der Augapfel seinen Inhalt entleert) aus der Augenhöhle herauspräparieren.

Wertbestimmung von Adrenalinlösungen.

Die isolierten Augen werden nach *Ehrmann* in kleine, unten geschlossene Glastrichterchen von 0·5 cm^3 Inhalt, welche in ein Reagenzglasgestell hineingesetzt werden können, die Pupille nach oben gekehrt, verbracht und zu dem einen Auge die mit physiologischer (d. h. 0·7%iger) Kochsalzlösung verdünnte Adrenalinlösung, zu dem anderen Auge desselben Tieres nur physiologische Kochsalzlösung zugefügt. Das zweite Auge dient zur Kontrolle. Die Pupille des ersteren erweitert sich, und zwar ist die

[1]) Vgl. *W. E. Dixon*, Colchicine with special reference to its mode of action on bone-marrow. Journ. of Physiol. Vol. 37. p. 53 (1908).

[2]) *R. Ehrmann*, Über eine physiologische Wertbestimmung des Adrenalins und seinen Nachweis im Blut. Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 53. S. 97 (1905).

Geschwindigkeit der Erweiterung und der Grad derselben abhängig von der vorhandenen Adrenalinmenge.[1]) Zweckmäßig verwendet man durch vorherige intensive Belichtung verengte Pupillen für den Versuch.

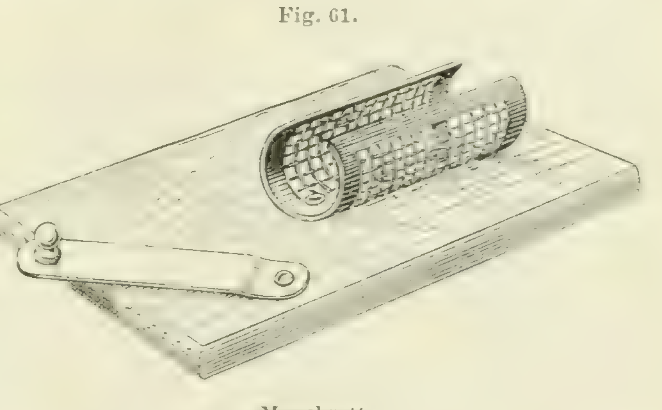
Von Adrenalin (Suprarenin. hydrochlor. Höchst) bewirken Verdünnungen von **1 : 1 Million** noch maximale Erweiterung der Pupille. **1 : 10 Millionen** hat noch deutliche, **1 : 20 Millionen** keine Wirkung mehr.

Die Methode ist zu orientierenden quantitativen Versuchen sehr bequem und brauchbar. Für größere Versuchsreihen erfordert sie zuviel Froschmaterial. Für solche ist die zugleich genauere Methode am Gefäßpräparat (s. d.) nach *Läwen-Trendelenburg* vorzuziehen.

Weiße Maus.

Weiße Mäuse sind zu Versuchen leicht zu beschaffen, da sie in vielen wissenschaftlichen Laboratorien, namentlich in pharmakologischen und hygienischen Universitätsinstituten, ausgedehnte Verwendung finden und darum von den Dienern derselben gezüchtet werden.

Fig. 61.



Mausbrett.

Über Mäusezucht vgl. *F. Fuhrmann*, Die wichtigsten Methoden beim Arbeiten mit Pilzen und Bakterien, in *E. Abderhaldens* Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Bd. 3. 2. Teil. Berlin 1910. S. 1269.

Gefüttert werden die Mäuse mit Brot oder Weizenkörnern und Wasser. Zu Versuchen, welche mehrere Tage andauern, nimmt man die Tiere aus dem Käfig, verbringt sie in Bechergläser mit etwas Watte und verschließt mit beschwertem Drahtnetz. Man ergreift die Mäuse am besten am Schwanz mit einer Tiegelzange.

Zu prüfende Substanzen werden den Mäusen entweder per os oder subkutan beigebracht. Man kann die zu untersuchende Substanz mit Süßholzpulver innig vermengen und mit Sirup daraus Pillen herstellen, welche man nach dem Trocknen zum Fressen gibt oder man kann nach *Ehrlich* die Substanz auf „Cakes“ verteilt[2]) verfüttern.

Will man die Maus subkutan injizieren, so geschieht dies am besten unter die Rückenhaut. Bequem zur Injektion ist ein kleines Mausbrett (Fig. 61), bestehend aus einer auf einem Brettchen befestigten Draht-

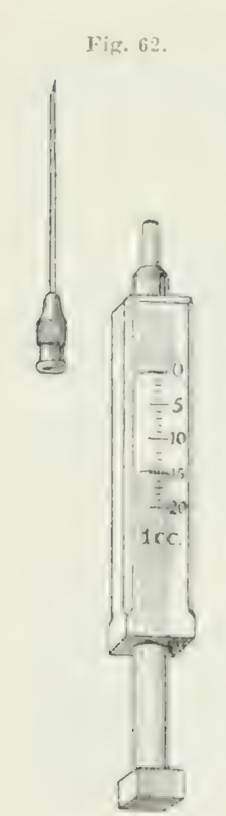
[1]) Gute photographische Wiedergaben normaler und durch Adrenalin erweiterter Froschpupillen finden sich bei *E. Abderhalden* und *F. Thies*, Weitere Studien über das physiologische Verhalten von l-, d- und dl-Suprarenin. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 59. S. 25 (1909).

[2]) Albert-Cakes werden mit der Lösung getränkt, sodann getrocknet, zerrieben und mit Hilfe von Wasser oder Milch nach Zusatz von 0·6 *g* Glidin pro Cake zu mög-

rinne, in welche das am Schwanze gehaltene Tier von vorn her, den Rücken nach oben, hineingezogen wird, worauf man den Schwanz unter dem Hebelarm festklemmt.

Man wird Mäusen, welche ein Gewicht von 10—20 *g* haben, im Durchschnitt eine Flüssigkeitsmenge **bis zu 1 *cm*³** injizieren. Zur Injektion von Bruchteilen eines Kubikzentimeters ist eine *Lieberg*sche Glasspritze von 1 *cm*³ Inhalt (Fig. 62) mit feiner Nadel geeignet. Zur Vornahme der Injektion unter die Rückenhaut erfaßt man mit der Pinzette oberhalb des Schwanzes, quer, eine größere Hautfalte, sticht die Nadel der gefüllten Spritze in die Längsrichtung der Falte ein und schiebt sie unter der Rückenhaut möglichst weit nach der Nackengegend vor. Je tiefer man die Injektion vornimmt, desto besser wird ein Auslaufen der Flüssigkeit aus der Einstichstelle vermieden. Nach Zurückziehen der Nadel kann man von der Injektionsstelle leicht nach oben hin massieren und das Tier dann aus dem Halter befreien.

Fig. 62.



Liebergspritze.

1. Der Nachweis von Colchicin.

Das Colchicin ruft an höheren Wirbeltieren charakteristische Vergiftungserscheinungen hervor, welche zu seiner Identifizierung verwertet werden können. Zur tödlichen Vergiftung von Katzen ist etwa 1 *mg* reines Colchicin pro Kilo Tier erforderlich. Der Colchicinvergiftung eigentümlich ist ihr langsamer Verlauf. Injiziert man einer Katze eine tödliche Dose, so verstreichen mehrere Stunden, bis die ersten Vergiftungssymptome, bestehend in Erbrechen und Durchfällen, sich zeigen. Unter Erstickungskrämpfen erfolgt der Tod des Tieres meist später als nach 7 Stunden. Bei der Sektion findet man im Magendarmkanal gewöhnlich zahlreiche Blutungen.

Colchicinmengen, wie sie zur tödlichen Vergiftung von Katzen nötig sind, werden in forensischen Fällen nur selten zur Prüfung am Tier vorhanden sein. Bei den meist vorliegenden kleinen Mengen ist der Vergiftungsversuch an der weißen Maus anzustellen. Für diese Tiere ist, bei einem Gewicht von 15—20 *g*, die tödliche Dose zwischen **5 100** und **2 10 *mg*** gelegen (*Fühner*[1]). Injiziert man Mäusen die Colchicinlösung etwa in obigen Mengen unter die Rückenhaut, so fressen sie nach der Injektion oft noch mehrere Stunden lang. Später machen sie einen kranken Eindruck, fressen nicht mehr, bewegen sich nur wenig und der vor der Vergiftung geballte Kot ist jetzt flüssig. Die Atmung wird allmählich

lichst konsistentem Teig angerührt, der auf Glasplatten ausgerollt und nach Zerschneiden in kleine Plättchen getrocknet wird. — *P. Ehrlich*, Chemotherapeutische Trypanosomenstudien. Berliner klin. Wochenschr., Nr. 9—12 (1907).

[1]) *H. Fühner*, Über den toxikologischen Nachweis des Colchicins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. Bd. **63**. S. 364 (1910).

stark verlangsamt und nimmt periodischen Charakter an. Meist erst nach 24 Stunden und später erliegen die Tiere der Vergiftung. Charakteristisch für das Colchicin ist auch bei der Maus in erster Linie der langsame Verlauf derselben. Blutungen im Darmkanal, welche auch bei der Katze fehlen können, sind bei Mäusen nicht beobachtet.

Fällt dieser Versuch an der weißen Maus und ein solcher am Frosch (s. d.), zu welchem gleichfalls kleine Colchicinmengen ausreichen, neben den chemischen Reaktionen, positiv aus, so kann der Nachweis von Colchicin als gelungen angesehen werden.

2. Der Nachweis von Strychnin.

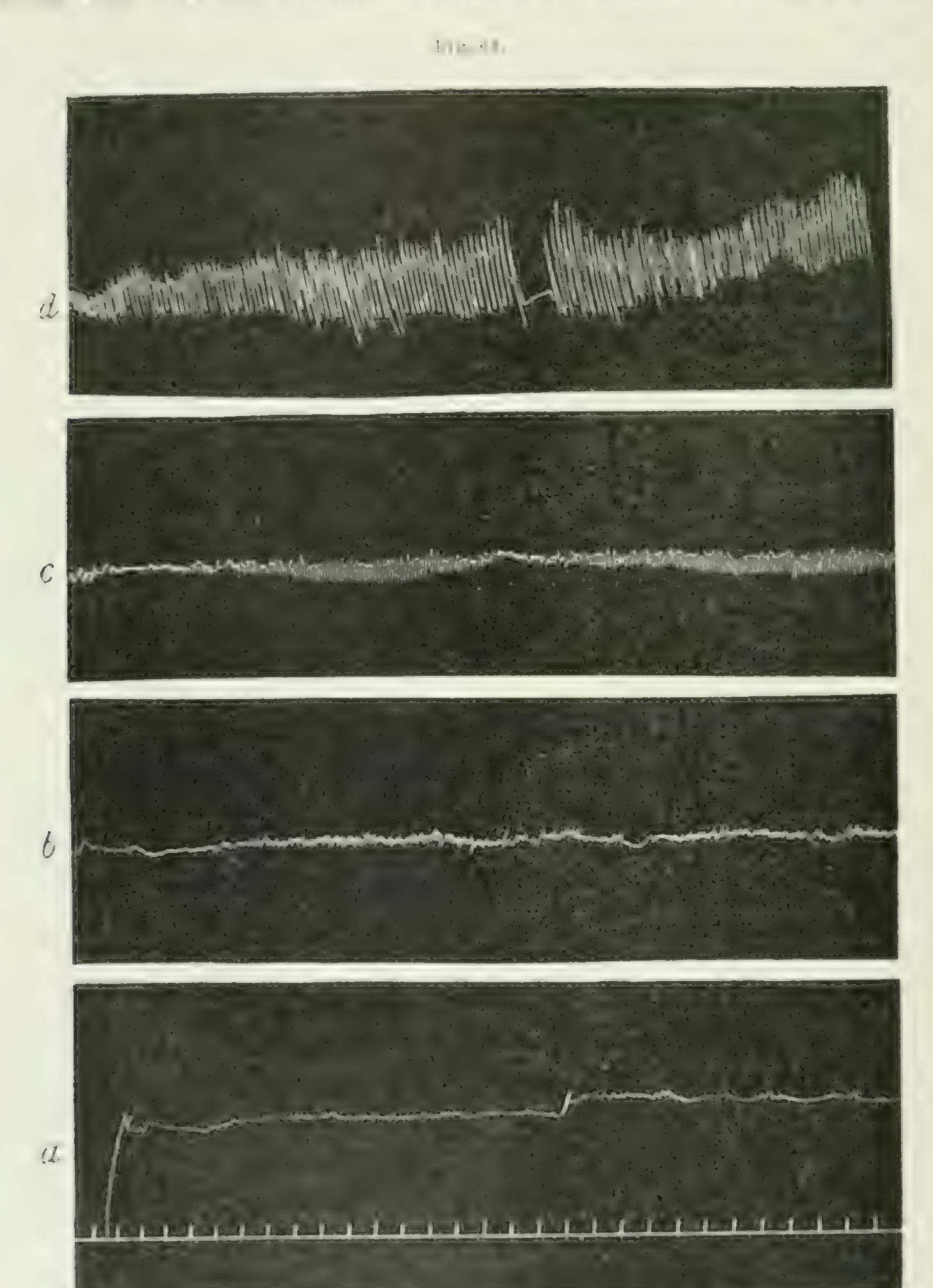
Zum Strychninnachweis sind nach *Falck*[1]) nur junge Mäuse im Alter von am besten 14—16 Tagen geeignet, welche ein Gewicht von 4—5 *g* besitzen. Ältere Tiere sind viel weniger empfindlich. Zur Injektion der kleinen Mäuse mit der auf Strychnin zu prüfenden Flüssigkeit werden dieselben am besten am Schwanz erfaßt, und unter Festhalten des Tieres durch einen Gehilfen, vorsichtig oberhalb der Schwanzgegend, mit scharfer feiner Nadel einstechend, unter die Rückenhaut injiziert. Bei Gegenwart von Strychninsalz in Menge von etwa **2 1000** ***mg*** bekommt die Maus 5—10 Minuten nach der Injektion Krämpfe, verbunden mit charakteristischer Zitterbewegung des Schwanzes, die, wie Fig. 63 zeigt, nach dem Vorgange von *Falck* graphisch aufgezeichnet werden kann. Dazu befestigt man am Schwanz des Tieres einen denselben um 1 *cm* überragenden feinen Draht, legt das Tier, das, sobald der erste Streckkrampf aufgetreten war, leicht Seitenlage erträgt, in solcher auf ein gestieltes Froschbrett und befestigt dieses in dem durch Trieb und Zahn vertikal verstellbaren Stativ. Zur Registrierung bringt man das Kymographion mit berußter Papierfläche in horizontaler Lage unter das Froschbrett, welches man durch Drehen am Stativ bis ganz nahe über die Trommel herabsenkt. Man legt die Maus an den unteren Rand des Froschbrettes und läßt den dasselbe überragenden Schwanz lose auf der Papierfläche schleifen. Durch beständig regulierendes Heben und Senken des Froschbrettes über der Trommel gelingt es leicht, die Schwanzbewegung vom Auftreten der anfänglichen schwachen Zitterbewegungen bis zu den späteren starken Ausschlägen kontinuierlich, in mehreren Reihen untereinander, auf der berußten Papierfläche zur Aufzeichnung zu bringen. Man verfolgt die Erscheinung etwa eine Stunde lang. Die Zeitmarkierung in Sekunden kann nachträglich, bei gleicher Geschwindigkeit der Trommel wie während des Versuches, auf dieser aufgezeichnet werden. Wie Fig. 63 zeigt, sind die Zitterbewegungen des Schwanzes etwa 10 Minuten nach der Injektion, also bald nach dem Auftreten der ersten Streckkrämpfe des Tieres sehr klein

[1]) *F. A. Falck*, Beitrag zum Nachweis des Strychnins. Vierteljahrsschr. f. gerichtl. Med. N. F. Bd. 41. S. 345 (1884).

und rasch *(a)*, steigern sich aber bei der genannten Dose bis zu starken und zugleich viel langsameren Bewegungen *(d)* im Verlaufe von [illegible] Stunden.

Dieser Versuch an der weißen Maus hat ungefähr dieselbe Empfindlichkeitsgrenze wie die chemische Probe mit Kaliumbichromat und Schwefel-

Fig. [illegible]



Weiße Maus. [illegible] Strychninnitrat. [illegible] des Schwanzes [illegible] Minuten nach der Injektion. Zeit = Sekunden.

säure und kann, mit dieser vereint, bei positivem Ausfall als beweisend für die Gegenwart von Strychnin angesehen werden.

Zur Herbeiführung der Strychninkrämpfe an jungen weißen Mäusen genügen geringere Giftmengen als bei Fröschen (s. d.). Nach *Falck* sind

zwar bei sehr kleinen Fröschen (Wasserfrösche von 2 *g*) auch schon Mengen des Nitrats von **5/1000** ***mg*** hierzu ausreichend. Doch sind solch kleine Frösche, im Gegensatz zu kleinen Mäusen, nicht immer zu beschaffen und dann sollen namentlich bei kleinen Fröschen schon geringfügige Verletzungen, ohne Vergiftung, Tetanus, wenn auch nur ausnahmsweise, herbeiführen können, was jedenfalls an der weißen Maus nicht der Fall ist. Der Versuch an der weißen Maus erscheint darum nicht nur empfindlicher, sondern auch beweiskräftiger als derjenige am Frosch.

3. Wertbestimmung von Schilddrüsenpräparaten.

Eine interessante Methode zur Wertbestimmung von Schilddrüsenpräparaten ist von *Reid Hunt*[1]) ausgearbeitet worden. Sie basiert auf der Beobachtung, daß weiße Mäuse, die mit wirksamer Schilddrüsensubstanz einige Zeit gefüttert wurden, gegenüber der Vergiftung mit Acetonitril eine außerordentlich gesteigerte Resistenz bekommen. Bezüglich der Ausführung der Methode muß auf die Originalarbeiten des genannten Autors und die Nachprüfung derselben durch *P. Trendelenburg*[2]) verwiesen werden.

Kaninchen.

Kaninchen[3]) sollen hier in ihrer Verwendung zum Nachweis des Ricins und zur Wertbestimmung von Fiebermitteln besprochen werden.

Man hält die Tiere während der Versuche in trichterförmigen Blechkästen (Fig. 64) mit doppeltem Siebboden, unter die ein Gefäß zum Auffangen des Harns gestellt wird.

1. Der Nachweis von Ricin.

Will man die Lösung einer Substanz, welche im Versuch am Blute (s. d.) Agglutinationswirkung gezeigt hat, als Ricin charakterisieren, so muß ihre Giftigkeit durch subkutane Injektion am Kaninchen erwiesen werden, da auch ungiftige auf gleiche Weise wie das Ricin, und zwar aus Bohnen dargestellte Präparate, die sogenannten Phasine, auf rote Blutkörperchen stark agglutinierend wirken, sich aber vom Ricin, Abrin etc. durch geringe Giftigkeit am Kaninchen unterscheiden. Ricin tötet Kaninchen noch in Mengen von **0·1** ***mg*** pro Kilo Tier und darunter (*Kobert*[4]), während von Phasin selbst Dosen von **10** ***mg*** unwirksam sind.

[1]) *Reid Hunt* and *Atherthon Seidell*, Studies on Thyroid. Hygienic Laboratory Bulletin Nr. 47. Washington 1909.

[2]) *P. Trendelenburg*, Über den Nachweis toxischer Stoffe im Blute thyreoidektomierter Tiere. Biochem. Zeitschr. Bd. **29**. S. 396 (1910).

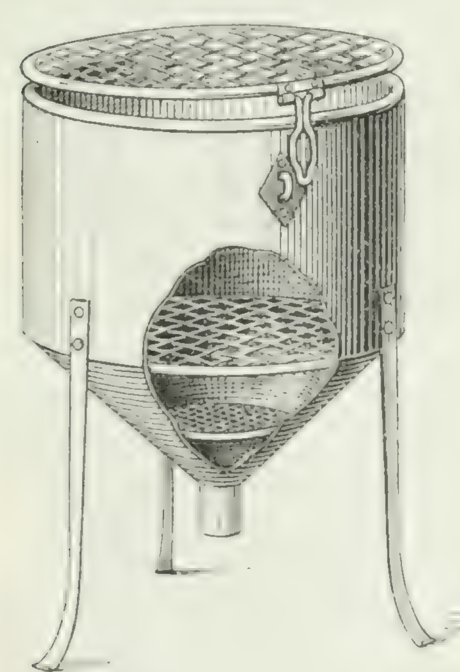
[3]) *U. Gerhardt*, Das Kaninchen. Leipzig 1910. — *A. Schumann*, Das Kaninchen. Stuttgart (s. a.).

[4]) *R. Kobert*, Einige Notizen über die Bedeutung und den biologischen Nachweis von vegetabilischen Agglutininen und Hämolysinen. Die Landwirtschaftl. Versuchsstationen. Berlin. Bd. **71**. S. 258 (1909).

Zur Prüfung auf Ricin wird die Lösung einem Kaninchen subkutan unter die Rückenhaut injiziert, in der weiter unten, bei der Prüfung der Fiebermittel, beschriebenen Weise.

Bei Injektion größerer Ricinmengen (etwa **1** *mg* pro Kilo Tier) beobachtet man nach *Fr. Müller*[1]) folgende Erscheinungen: In den ersten 12—14 Stunden verhält sich das Tier durchaus normal, nimmt Nahrung zu sich und scheidet Harn in gewohnter Menge aus. Nach 24 bis 30 Stunden tritt die tödliche Giftwirkung plötzlich hervor. Das Tier fällt um, kann allgemeine Krämpfe zeigen, liegt dann bald schlaff auf Bauch oder Seite und kann sich nicht mehr aufrichten. Krämpfe können noch wiederholt auftreten, werden aber allmählich schwächer und etwa $^1/_2$ Stunde nach dem ersten Anfall tritt der Tod ein. Doch kann auch der Tod ohne Krämpfe nach vorausgehender kurzer Atemnot und bald einsetzender schlaffer Lähmung des Tieres eintreten. In den letzten Lebensstunden zeigen sich häufig profuse Diarrhöen. Erhöhung oder Verminderung der wirksamen Dose des Ricins ist nur von Einfluß auf das Stadium der Inkubation, d. h. das Stadium vor dem Einsetzen der akuten Erscheinungen. Dieses kann bei geringen Dosen mehrere Tage andauern.


Fig. 64.


Kaninchentrichter.

Bei der Sektion des verendeten Tieres ist als charakteristisch für die Ricinvergiftung besonders der Befund von seiten des Darmes anzusprechen. Hier finden sich viele Blutungen, dann besonders auffallend Schwellung und Rötung der *Peyer*schen Plaques. Daneben findet man Schwellung und Rötung der retroperitonealen Lymphdrüsen. Für die lokale Wirkung des Ricins ist dann noch typisch die sulzige Nekrose des Gewebes, welche sich an der Injektionsstelle unter der Rückenhaut ausbildet.

2. Wertbestimmung von Fiebermitteln.

Nach der von *M. Kiliani*[2]) ausgearbeiteten Methode verfährt man in der Weise, daß man am Kaninchen durch subkutane Injektion sterilisierter Kulturen von Bacterium coli Fieber erzeugt und dieses Fieber durch

[1]) *Fr. Müller,* Beiträge zur Toxikologie des Ricins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakologie. Bd. **42**. S. 305 (1899).

[2]) *M. Kiliani,* Pharmakologische Wertbestimmung der technischen Fiebermittel. Arch. internation. de pharmacodyn. et de thérapie. T. **20**. p. 333 (1910).

Eingabe der zu prüfenden Substanz herabzudrücken sucht, wobei die Wirkung derselben mit derjenigen von in ihrer Wirkung bekannten Fiebermitteln, wie Antipyrin oder Pyramidon, verglichen wird.

Herstellung der Bakterienkultur. Eine mindestens 3—4 Wochen in einem auf 30—37° (nicht höher!) eingestellten Thermostaten gewachsene Coli-Bouillonkultur filtriert man durch ein Ton-(Pukal-)filter. Der Rückstand der Filtration wird vom Filter abgeschabt, in der zu feiner Verteilung eben genügenden Glyzerinmenge im Achatmörser gut verrieben und eine Viertelstunde bei etwa 100° erhitzt, was einmal Sterilisierung und zweitens Aufschließung der Bakterienleiber, welche die Hauptmenge des Fiebergiftes enthalten, bezweckt.

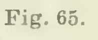
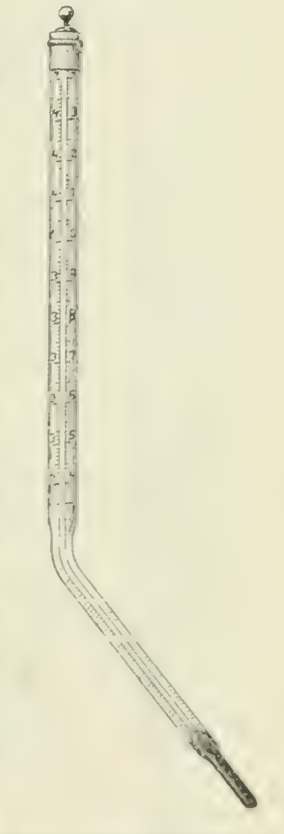


Fig. 65.



Kaninchenthermometer.

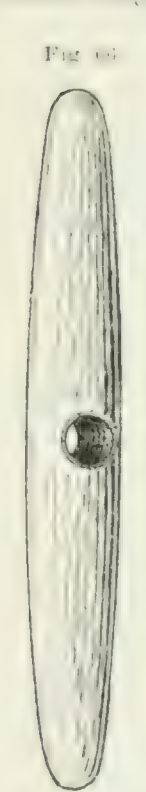
Die Fiebererzeugung am Kaninchen geschieht durch subkutane Injektion dieser Bakteriensuspension, und zwar erhalten davon Tiere unter 1500 *g* 0·2 *cm*³ in 2 *cm*³ Filtrat der Kultur, Tiere über 1500 *g* die doppelte Menge. Zur subkutanen Injektion des Kaninchens, welche am besten unter die Rückenhaut vorgenommen wird, hebt man hier eine größere Falte auf und sticht mit der scharfen Nadel der gefüllten Injektionsspritze (2—5 *cm*³) in der Längsrichtung der Falte ein. Vor Entleerung der Spritze wird man sich durch Befühlen überzeugen, ob die Nadelspitze unter der Haut liegt. Man entleert den Spritzeninhalt, zieht die Nadel zurück und verteilt durch leichte Massage die unter die Haut gebrachte Flüssigkeit.

Vor der Injektion der Kolikultur mißt man die Temperatur des Tieres. Die normale Temperatur des Kaninchens, im Mastdarm gemessen, beträgt durchschnittlich 39°. Die Breite der Tagesschwankung des Normaltieres beträgt höchstens 1°. Doch erfolgt diese Veränderung langsam und allmählich, niemals kritisch, wie bei Verabreichung eines Fiebermittels.

Die Temperaturmessung des Kaninchens geschieht im Mastdarm mit einem gekrümmten Thermometer (Fig. 65). Man setzt sich zur Vornahme der Messung auf einen Stuhl und hält das Tier, sein Hinterteil nach auswärts, auf den Beinen fest. Dann ergreift man mit einer Hand kräftig den Schwanz des Tieres, drückt dabei mit dem Handgelenk zugleich den gekrümmten Rücken nach unten durch, zur besseren Streckung des Darmes, und führt mit der anderen Hand das mit Öl eingefettete Thermometer etwa 10 *cm* tief (bis zu der Krümmung) ohne Anwendung von Gewalt in den Mastdarm ein. Sobald die Temperatur nicht mehr weiter steigt, liest man ab und zieht das Thermometer zurück. Frühestens vier Stunden nach Injektion der Kultur wird durch zweimalige Temperaturmessung im Abstand von $^1/_2$—1 Stunde die Höhe des Fiebers festgestellt und dann das zu prüfende Antipyreticum gegeben.

Handelt es sich um Feststellung der Wirksamkeit an sich, so gibt man dem Tiere die zu prüfende Substanz in Menge von etwa 0·5 *g* pro Kilo innerlich in Lösung oder als Pulver. Letzteres kann geschehen, indem man dem durch einen Gehilfen gehaltenen Tiere das Maul mit einer Kieferklemme aufhält und das in einem Glasrohr befindliche trockene Pulver möglichst tief in den Rachen schüttet. Durch Zuhalten der Nase veranlaßt man das Tier zum Schlucken. Diese Methode eignet sich namentlich für in Wasser schwerlösliche Präparate. Leichtlösliche Substanzen gibt man in wässeriger Lösung mit der Schlundsonde in den Magen. Hierzu ergreift ein Gehilfe das Tier mit einer Hand erst an den Ohren und erfaßt dann mit der anderen nacheinander Hinter- und Vorderbeine des herabhängenden Tieres. Man führt darauf den in Fig. 66 gezeichneten runden, 12 *cm* langen Holzknebel seitlich in das Maul ein. Derselbe wird vom Gehilfen mit der ersten, über den Kopf greifenden Hand, im Maul in richtiger Lage festgehalten. Man sucht dann durch das Loch in dem Knebel eine etwa 3 *mm* dicke und 30 *cm* lange Sonde in den Magen des Tieres einzuführen. Hierbei muß man an der hinteren Rachenwand entlang gehen und vermeiden, in die Luftröhre zu gelangen. Das Einführen der mit Seife oder Öl glatt gemachten Sonde muß leicht und ohne Anwendung von Gewalt gelingen. Spürt man Widerstand, so zieht man zurück und schiebt von neuem vor. Als Sonde verwendet man einen weichen Nelatonkatheder. Ist derselbe zu biegsam, so wird ein eingesteckter Draht mit eingeführt und nachher entfernt. An dem Ende der Sonde befindet sich ein Stück Gummischlauch und ein kleiner Trichter, in welchen man die Flüssigkeit gießt. Fließt der Trichterinhalt nicht ab, so muß man das Abfließen durch leichtes Vor- und Zurückziehen der Sonde, Kneten des Gummischlauches oder Druck auf die Flüssigkeitsoberfläche zu erreichen suchen.

Fig. 66.



Kaninchenknebel.

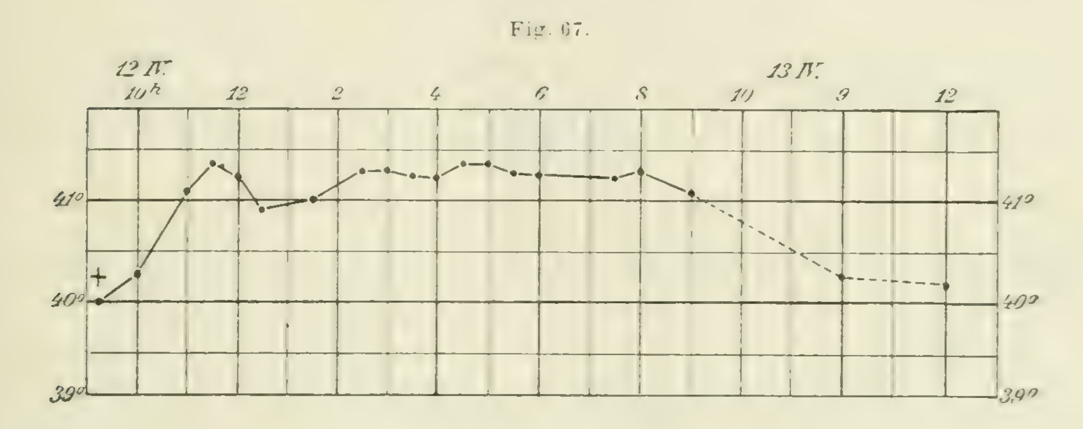
Nachdem die Substanz in Pulverform oder Lösung in den Magen gebracht wurde, muß die Temperatur nach $^1/_2$ Stunde und später noch wiederholt gemessen werden, um eine etwaige Wirkung der Substanz feststellen zu können. Als Substanzwirkung kann eine Temperatursenkung von mindestens $^1/_2$ Grad im Verlaufe von einer bis längstens zwei Stunden (je nach der Resorptionsgeschwindigkeit des Präparates) angesehen werden.

Zur Feststellung wirksamer Minimalgaben eignet sich besser die Subkutanapplikation, wobei pro Kilo Tier 0·025—0·1 gegeben werden kann und eine Wirkung von mindestens $^1/_2$ Grad 1 Stunde nach der Injektion eingetreten sein muß.

Von den beiden im Texte wiedergegebenen Kurven (nach *Kiliani*) zeigt die erste (Fig. 67) die fiebererzeugende Wirkung einer Kolibakteriensuspension am Kaninchen und die allmähliche Rückkehr der Temperatur des Tieres zur Norm.

Fig. 68 zeigt an einem anderen Tier, das mit gleicher Bakterienmenge wie das erste infiziert wurde, ein vorübergehendes starkes Absinken der Kurve durch die Menge von **50 mg** Pyramidon. Größere Dosen der

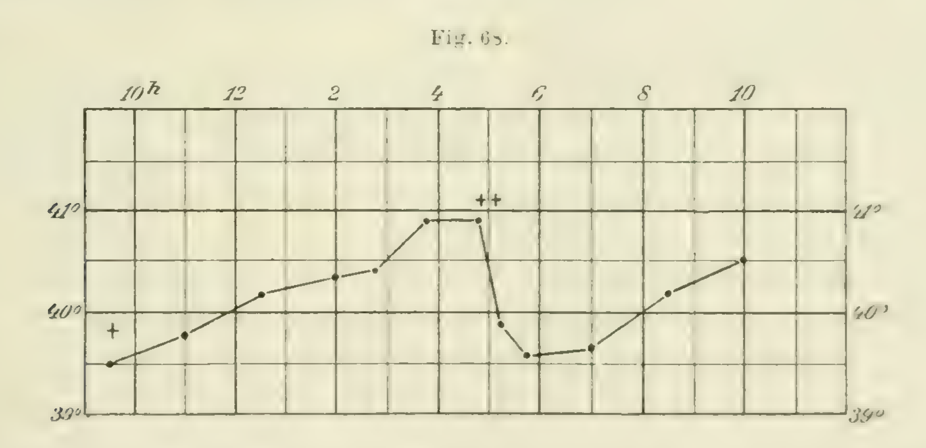
Fig. 67.



Kaninchen von 2020 *g*. Fieber durch subkutane Injektion von 0·4 cm^3 Bakteriensuspension im 4·0 cm^3 Kolibouillonfiltrat. Injektion bei +. (Nach *Kiliani.*)

Antipyretika können unter den angegebenen Bedingungen dauernde Entfieberung der Tiere bewirken.

Fig. 68.



Kaninchen von 1550 *g*. Fieber durch Injektion wie oben (+). Bei ++ subkutane Injektion von 0·05 *g* Pyramidon. Wirkung: Vorübergehende Temperatursenkung. (Nach *Kiliani.*)

Auf die voraussichtliche Wirkung einer am Kaninchen geprüften Substanz beim fiebernden Menschen ist vor allem aus dem Versuch bei innerlicher Darreichung ein Rückschluß möglich.

Mensch.

Auf die Gegenwart einer Anzahl von Giften kann der Untersucher im Verlaufe einer toxikologischen Analyse, namentlich bei Vornahme von Destillationen, schon durch eigentümliche Geruchsqualitäten mancher Gifte aufmerksam werden. Hierher gehören Substanzen, wie Chlor, Brom, Jod, Phosphor, Blausäure, Alkohol, Äther, Chloroform, Jodo-

form, Phenol und Kresole, Nitrobenzol, Anilin, Pyridin, Piperidin, Chinolin und von Alkaloiden namentlich Coniin und Nicotin.

Sehr wichtig zur Erkennung vieler Substanzen ist ihre Prüfung auf der Zungenspitze. Durch bitteren Geschmack machen sich Strychnin, Brucin, Chinin, Colchicin, Pikrotoxin, Pikrinsäure bemerkbar, während Cocain und ihm in der Wirkung nahestehende Produkte durch Lähmung der sensiblen Nervenenden Gefühllosigkeit hervorrufen, Aconitin und Veratrin dagegen durch deren Erregung ein Gefühl des Brennens erzeugen.

Der Nachweis hautreizender und namentlich blasenziehender Substanzen, wie in erster Linie des Cantharidins, geschieht am besten am eigenen Körper. Man löst dazu den zu prüfenden Rückstand in wenig heißem Mandelöl, tränkt damit ein Stückchen Watte und befestigt dies an einer empfindlichen Stelle der Brusthaut oder des Arms mit etwas Heftpflaster. Noch durch **1/10 *mg*** Cantharidin kann Blasenbildung, durch geringere Mengen Hautrötung hervorgerufen werden. Gleichzeitige Anbringung eines zur Kontrolle nur mit Öl getränkten Wattebausches ist empfehlenswert.

Versuche am Menschen kommen weiterhin vor allem dann in Frage, wenn es sich um den Nachweis kleiner Mengen von Giften handelt, die, wie Physostigmin und Atropin, durch ihre Beeinflussung der Pupillenweite (vgl. die Angaben beim Froschauge) charakterisiert werden können. Am wichtigsten und zugleich am empfindlichsten ist der Nachweis des Atropins und der ihm nahestehenden Alkaloide Scopolamin, Duboisin etc., welche das Atropin zum Teil noch an Wirksamkeit übertreffen.

Zur Prüfung am Menschenauge muß der aus organischem Material gewonnene Rückstand weitgehend gereinigt sein, namentlich darf derselbe nicht sauer, eher etwas alkalisch, gegen Lackmus reagieren. Zur Prüfung werden 2—3 Tropfen einer wässerigen Lösung mit Pipette oder Glasstab in den Bindehautsack des einen Auges gebracht, während das zweite Auge der Kontrolle dient. Natürlich muß man sich vor Anstellung des Versuches von der Pupillengleichheit bei der Versuchsperson, am besten durch Messung, überzeugt haben. Nach ein und zwei Stunden untersucht man, ob Pupillendifferenz vorhanden ist. Schwache Grade können nur durch Messung festgestellt werden. Nach *Feddersen*[1]) tritt am gesunden Menschenauge noch durch **1—2 zehntausendstel Milligramm** Atropin erkennbare Pupillenerweiterung auf.

Von quantitativen Bestimmungen des Wirkungswertes von Arzneimitteln, die in Selbstversuchen vorgenommen werden können, sei hier eine von *H. Braun* u. a.[2]) ausgearbeitete Methode der vergleichenden

[1]) Zitiert nach *J. Kratter,* Beiträge zur Lehre von den Vergiftungen. Leipzig 1905. S. 120.

[2]) Vgl. *F. M. Recke,* Vergleichende experimentelle Untersuchungen lokalanästhetischer Mittel. Dissertat. Leipzig 1903.

Wertbestimmung lokalanästhesierender Mittel, welche als Ersatz für das Cocain in Betracht kommen, genannt.

Übersicht der im Texte erwähnten Gifte in alphabetischer Reihenfolge.

Ricin: Nachweis am Blut, am Kaninchen.

Saponin: Nachweis am Blut.

Schilddrüsenpräparate: Wertbestimmung an der Maus.

Scopolamin: Nachweis am Froschauge, am Menschenauge.

Solanin: Nachweis am Blut.

Strophanthin vgl. Produkte mit Digitalinwirkung.

Strychnin: Nachweis am ganzen Frosch, an der Maus.

Theobromin vgl. Coffein.

Tierische Gifte: Nachweis am Blut.

Veratrin: Nachweis am ganzen Frosch, am isolierten Skelettmuskel, an der menschlichen Zunge.

Methoden zur Bestimmung des Blutdrucks.

Von **Erwin Rohde,** Heidelberg.

Wenn wir von Blutdruckmessung schlechtweg sprechen, so meinen wir die Messung des arteriellen Drucks, und zwar des Seitendrucks in den großen Arterien des Körpers. Auch bei der unblutigen Blutdruckmessung am Menschen, für die derzeit eine Reihe von Methoden ausgebildet sind, sucht man den Druck in einer möglichst großen Arterie, und zwar am Oberarm zu bestimmen. Der Biochemiker dürfte kaum in die Lage kommen, diese klinischen Methoden am Menschen anzuwenden; hingegen fällt es noch in das Grenzgebiet biochemischer Untersuchungen, sich im Tierexperiment gegebenenfalls selbst über die Wirkung chemischer Substanzen auf die Kreislaufsverhältnisse orientieren zu können. Alle gröberen Einwirkungen auf den Kreislauf führen zu Veränderungen des Aortendrucks. Wir erschließen deshalb Kreislaufswirkungen der Substanzen zunächst aus dem Blutdruckversuch, in welchem man eine Messung des Aortendrucks mit einer exakten Schreibung der Pulsfrequenz verbindet und zugleich ein Urteil über die Qualität des Herzschlages gewinnt; durch Reizung der Herz- und Gefäßnerven und durch andere experimentelle Eingriffe während des Blutdruckversuchs ergibt sich eine nähere Analyse der Kreislaufsänderung. Eine kurze Darstellung der Methoden, die sich den Zwecken des Biochemikers entsprechend auf eine erste Orientierung beschränkt, mag deshalb auch in diesem Handbuch am Platze sein. Sie soll dem Biochemiker praktische Winke für die Anstellung eines Blutdruckversuches geben und durch eine Besprechung der gebräuchlichsten Registrierapparate und ihrer Leistungen die Wahl des für den betreffenden Fall geeigneten Apparates erleichtern.

Verbindet man mit dem blutdruckregistrierenden Apparate eine endständig in die Karotis eingeführte Kanüle, so mißt man, da dieses Gefäß fast rechtwinklig aus der Aorta entspringt, den Seitendruck in diesem Hauptstamm des Gefäßbaumes. Der Aortendruck hängt bekanntlich von der in der Zeiteinheit vom Herzen in das Gefäßsystem beförderten Blutmenge, dem Zufluß der Aorta, und andererseits vom Abfluß, d. h. von den Widerständen der kleinen Arterien ab. Die bei der Tätigkeit der Organe stets

wechselnden, durch lokale Gefäßerweiterung oder Gefäßverengerung veränderlichen Widerstände in den einzelnen Gefäßprovinzen werden durch kompensatorische Verengung oder Erweiterung anderer Gefäßprovinzen leicht ausgeglichen, solange sie sich in physiologischen Grenzen halten. Aber auch darüber hinausgehende Veränderungen vermag der Organismus auszugleichen, wenn sie nicht allzu große Gefäßgebiete betreffen, so daß lokale Kreislaufstörungen noch keineswegs auf den Blutdruck in der Aorta zurückzuwirken brauchen. Sie müssen durch Plethysmographie und andere Methoden festgestellt werden. Auch Änderungen des Gesamtwiderstandes im Gefäßbaum werden zunächst durch Änderungen der Herztätigkeit, Änderungen der Herztätigkeit durch Veränderungen der Vasomotion kompensiert. Erst wenn diese Regulationseinrichtungen des Kreislaufes nicht mehr hinreichen, kommt es zu Veränderungen des mittleren Druckes in der Aorta. Abweichungen von dem normalen Mitteldruck in der Aorta weisen sonach schon auf weitgehende Störungen des Kreislaufes hin. Es ist begreiflich, daß die richtige Deutung aller für den Zustand des Kreislaufes im Blutdruckversuch gewonnenen Anzeichen eigentlich die gesamte Kreislaufsphysiologie zur Voraussetzung hat.

Zur Vorbereitung des Blutdruckversuches gehören die Instandsetzung des Apparates, die Narkose und Präparation des Tieres und die Verbindung der Karotis mit dem Blutdruckapparat.

Heftige Muskelbewegungen des Tieres verändern den Blutdruck; deshalb erleichtert die Immobilisierung den Versuch. Auch hiervon abgesehen wird man aber die Versuchstiere, wenn es der Versuch irgendwie erlaubt, zu narkotisieren wünschen. Hierfür sind aber nur solche Mittel verwendbar, die die Kreislaufsverhältnisse nicht selbst wesentlich verändern. Für die Kaninchen entspricht das Urethan dieser Anforderung. Es wird am besten etwa $^1/_2$ Stunde vor Anstellung des Versuchs in der Dosis von 1—$1^1/_2$ *g* pro Kilogramm in 10%iger Lösung mit der Schlundsonde in den Magen der Tiere injiziert. Auch andere, für den Kreislauf unschädliche Substanzen der Alkoholgruppe, wie der Bromisovalerianylharnstoff (Bromural) oder das Bromdiäthylazetamid (Neuronal), können Verwendung finden. Hingegen beeinflussen narkotisierende Gaben von Chloralhydrat den Kreislauf in allzu störender Weise. Für Katzen ist die Äthernarkose wohl das brauchbarste Verfahren. Für Hunde wird meist die Kombination von Morphin mit nachfolgender Äthernarkose benützt; Chloroform ist wegen seiner starken Kreislaufwirkung ausgeschlossen. Das Morphin muß dabei in einer Gabe von etwa 7—8 *mg* pro Kilogramm einige Zeit vor Anstellung des Versuchs subkutan injiziert werden. Die so vorbereiteten Tiere sind dann der Äthernarkose leicht zugänglich, doch hat das Morphin den Nachteil, das Vaguszentrum zu erregen und eine bedeutende Pulsverlangsamung besonders am Hund hervorzurufen; schon dies beweist, daß der Kreislauf nach solchen Morphingaben keineswegs normal ist.

Keines der üblichen Narkotika ist demnach völlig einwandfrei. Dies gilt insbesondere für die Versuche an Hunden und Katzen. Feinere Reak-

tionen der Herz- und Gefäßnerven, z. B. die Wirkung des Nerv. depressor, werden mehr oder weniger durch alle Narkotika gestört. Es bleibt sonach nichts übrig, als die am narkotisierten Tier beobachteten Erscheinungen auch an dem kurarisierten Tiere zu kontrollieren. Die bei den englischen Physiologen übliche Dezerebrierung (Abtrennung des Großhirns vom Hirnstamm) setzt erst recht pathologische Verhältnisse für den Kreislauf, so gut diese Methode für andere Zwecke brauchbar sein mag. Auch die Kurarisierung muß vorsichtig und nur mit den eben wirksamen Gaben durchgeführt werden. Schlechte Kuraresorten, welche neben den auf die motorischen Nerven wirksamen Kurarinen auch sogenannte Kurine enthalten, schädigen gleichfalls den Kreislauf. Das sogenannte Curaril [1], die Lösung eines guten und auf gleichmäßige Wirksamkeit eingestellten, wenn auch noch unreinen Kurareextraktes wird deshalb den Experimentatoren ein erwünschtes Hilfsmittel sein. Man injiziert das Kurarepräparat intravenös, bis die Reizung des bloßgelegten Ischiadikus unwirksam wird, respektive bis die spontane Atmung aufhört. Nach Einleitung künstlicher Respiration durch eine Trachealkanüle ist der Blutdruck sehr regelmäßig. Die Kurarisierung hat aber den Nachteil, daß das Verhalten der Respiration und des Bewegungsapparates während des Blutdruckversuches nicht gleichzeitig beobachtet werden kann.

Ist das Versuchstier durch ein Narkotikum oder Kurare immobilisiert und aufgebunden, so wird die Karotis freigelegt, ihr peripheres Ende ligiert, das zentrale mittelst einer Klemmpinzette abgeklemmt und in das so isolierte Stück eine passende Glaskanüle in der Richtung nach dem Herzen eingeführt. Meist werden auch die Gefäß- und Herznerven zum Zweck ihrer Funktionsprüfung im Versuche isoliert und auf Fäden gelegt.

Die Kanüle und ihre Verbindung zu dem blutdruckschreibenden Apparate muß mit einer gerinnungshemmenden Flüssigkeit gefüllt werden. Als solche sind verschiedene Flüssigkeiten empfohlen. Für Hunde und Kaninchen ist eine ca. 25%ige Magnesiumsulfatlösung sehr geeignet. Für Katzen ist dieses Salz aber besonders giftig, so daß schon der Übertritt geringer Mengen der Magnesiumlösung bei fallendem Blutdruck zu schwerer Kreislaufschädigung führt. Für Katzen, aber auch sonst für alle Versuche, in denen größere Blutdruckschwankungen zu erwarten sind, sind deshalb gesättigte Natriumkarbonatlösungen respektive Bikarbonatlösungen, die nach langem Stehen wahrscheinlich 1½fach kohlensaures Natron enthalten, vorzuziehen. Ein Gemisch des einfach und doppelt kohlensauren Salzes: auf 4 *l* Wasser 186 *g* Natriumbikarbonat und 286 *g* Natriumkarbonat ist geeignet. Will man mit Sicherheit die Störung des Blutdruckversuches durch Gerinnung verhindern, so ist es noch zweckmäßig, etwas Blutegelextrakt in die Karotiskanüle zu bringen. Hierfür steht derzeit der durch *Jacobj* [2]) in eine relativ reine und konzen-

[1]) Curaril I und II, Chemische Werke vorm. Dr. Heinrich Byk, Berlin

[2]) *Franz*, Über den die Blutgerinnung aufhebenden Bestandteil des medizinischen Blutegels. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. IL. S. 342. 1903

trierte Form gebrachte Bestandteil des gerinnungshemmenden Blutegelextraktes, das Hirudin, zur Verfügung. 1 *mg* des Präparates verhindert die Gerinnung von 7·5 cm^3 Blut.

Zur Messung und graphischen Registrierung des Blutdruckes dienen das Manometer und das Kymographion. Während über die Kymographien wenig zu sagen sein wird, weil ihre Konstruktionen im wesentlichen den praktischen Anforderungen genügen, müssen wir der Besprechung der Manometer einen größeren Platz einräumen, da bei der sehr verschiedenen Güte der einzelnen Instrumente nur eine richtige Handhabung und Kritik brauchbare Resultate ergeben kann.

Zunächst sollen die Kymographien, dann erst die Manometer besprochen werden, weil zum Verständnis der Kurvenbilder im Kapitel über Manometer die Kenntnis der Schreibflächen gehört.

Das Kymographion.

Die Aufzeichnung der vom Manometer wiedergegebenen Blutdruckschwankungen geschieht an einer bewegten Fläche, und zwar entweder durch Ruß- oder Tintenschreibung auf Papier oder durch photographische Fixierung eines Lichtpunktes. Man erhält so Kurven, deren Abscissen die Zeit, deren Ordinaten die Druckwerte darstellen.

Nur die Papierregistrierung soll hier besprochen werden; über die photographische Registrierung siehe die ausführliche Darstellung in *Tigerstedts* Handbuch der physiologischen Methodik, Bd. I. 1. (Leipzig, Verlag von S. Hirzel, 1910.)

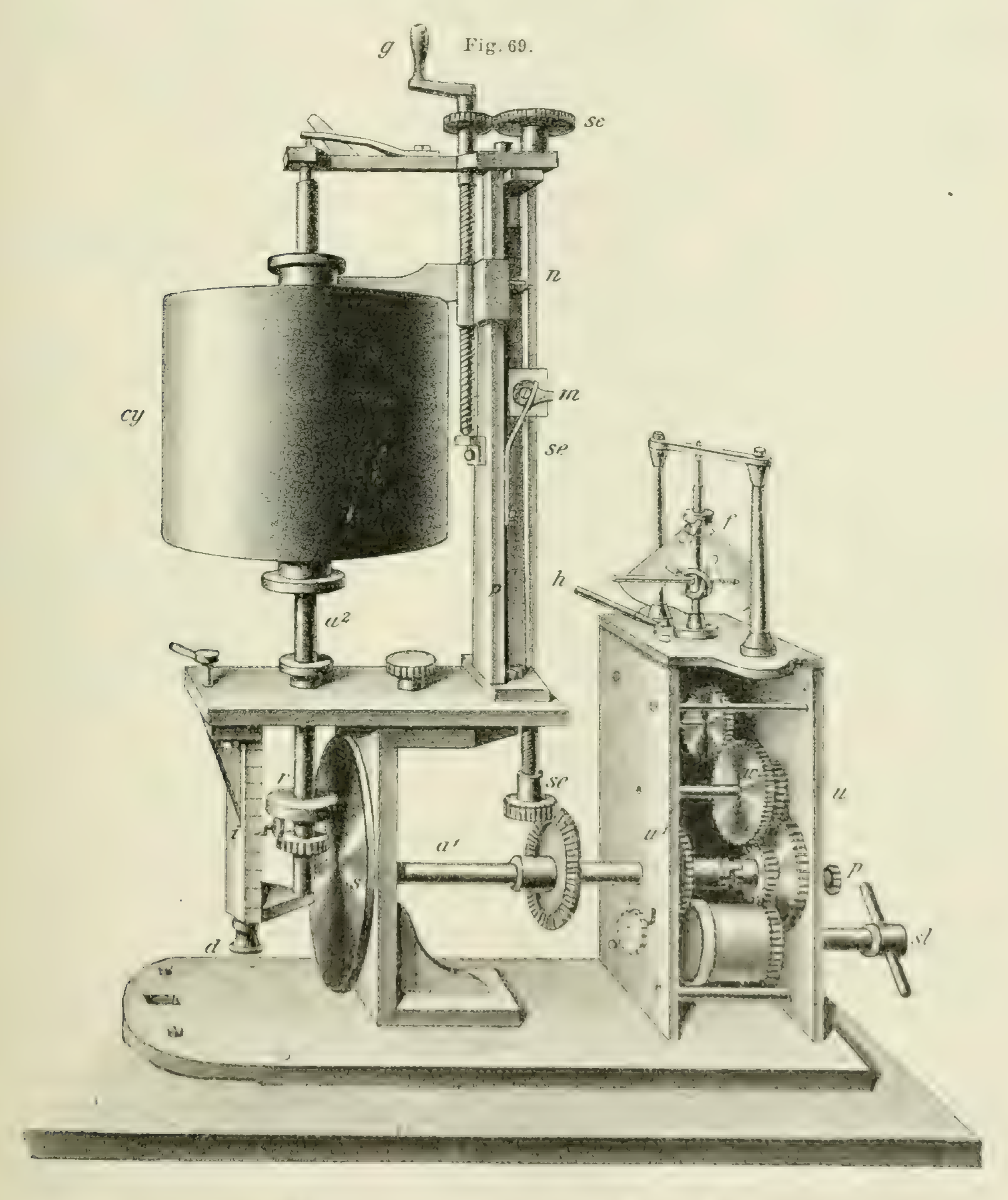
Das gebräuchlichste Kymographion ist das *Ludwig-Baltzar*sche Kymographion; seine Schreibfläche befindet sich auf einer mit Papier umklebten Trommel, die durch ein Uhrwerk in Rotation gesetzt wird. Die Umdrehungsgeschwindigkeit kann durch Wechselräder beliebig verändert werden; sie variiert etwas nach der Federspannung und muß deshalb stets durch eine gleichzeitige Zeitschreibung kontrolliert werden. Das Papier wird nach dem Aufkleben auf die Trommel gleichmäßig und nicht zu dicht über einer leuchtenden Gasflamme berußt, nach dem Versuch abgeschnitten und die Kurve in verdünntem Spirituslack ($^1/_3$ des käuflichen Präparates in $^2/_3$ absolutem Alkohol) fixiert.

Für vertikale Schreibung, z. B. für den Schwimmer des Hg-Manometers ist diese Trommelschreibung ohne weiteres brauchbar, für Bogenschreibung dagegen, wie sie sich bei den meisten elastischen Manometern findet, stellt die zylindrisch gekrümmte Trommeloberfläche, zumal bei größeren Exkursionen, eine Fehlerquelle dar wegen der wechselnden Stärke der Anlagerung. Für manche Versuche ist deshalb eine der neueren Konstruktionen vorzuziehen, bei denen ein längerer berußter Papierstreifen um 2 Trommeln läuft und eine ebene Fläche zur Schreibung besitzt (Schleifen-Kymographion).

Für die großen und trägen Exkursionen des Quecksilber-Manometers haben sich Kymographien mit endlosem Papier und Tintenschreibung gut

bewährt. Das weiße Papier wickelt sich von einer Trommel ab, zieht in ebener Fläche am Schreiber vorbei und wird von einer zweiten Trommel aufgewickelt; der Schreiber ist an der Spitze des Schwimmers befestigt und wird mit roter Tinte (mit $^2/_3$ Wasser verdünnt) beschickt.

Fig. 69.



Das Kymographion, nach *Ludwig* und *Baltzar*. $^1/_4$.

Zur **Zeitschreibung** benutzt man entweder ein käufliches graphisches Chronometer nach *Jaquet*[1]), welches 1 und $^1/_5$ Sekunde zu markieren erlaubt oder aber ein elektrisches Signal, welches mit einem entsprechend konstruierten Uhrwerk verbunden ist.

[1]) *Jaquet*, Studien über graphische Zeitregistrierung. Zeitschr. f. Biologie. 1890. XXVIII. S. 1.

Die Manometer.

Die Wahl des Instrumentes ergibt sich aus den Anforderungen, die an die genaue Wiedergabe der im Kreislauf auftretenden Druckschwankungen gestellt werden. Solcher Druckschwankungen gibt es langsamere und schnellere: die schnelleren werden durch die einzelnen Herzschläge hervorgerufen und finden ca. 1—4mal in der Sekunde statt, die langsameren gehen synchron der Atemrhythmik oder sie verdanken ihre Entstehung irgend welchen Eingriffen, z. B. einer Vagusreizung oder dem Einwirken eines Kreislaufgiftes.

Zur Druckregistrierung stehen uns nun verschieden konstruierte Manometer zur Verfügung. Um ihre Leistungen und damit ihr Anwendungsgebiet genau präzisieren zu können, müssen wir mit wenigen Worten auf die Konstruktion und die Theorie der Manometer eingehen.[1])

Unter einem Manometer versteht man ein Instrument, das zur Registrierung hydrostatischen Druckes dient; es besteht aus einer mit Flüssigkeit[2]) gefüllten Röhre, die an einem Ende durch eine Kanüle mit dem Lumen des Gefäßsystems in Verbindung steht; am anderen Ende wird die Größe des einwirkenden Druckes an der Größe von Gegenkräften gemessen, welche durch Verschiebung der Flüssigkeit erzeugt werden und diesem das Gleichgewicht zu halten vermögen. Als solcher Gegenkräfte bedient man sich der Elastizität einer Gummimembran, einer Feder oder einer Flüssigkeitssäule. Jedem Druck entspricht eine bestimmte Gleichgewichtslage, also eine bestimmte Ausbuchtung der Gummimembran, eine bestimmte Durchbiegung der Feder oder die Hebung der Flüssigkeitssäule auf eine bestimmte Höhe. Die einzelnen Manometer unterscheiden sich nun im wesentlichen durch die Größe der Flüssigkeitsverschiebung, die nötig ist, um denselben Druck hervorzurufen; je größer diese Flüssigkeitsverschiebung ist, desto größer ist der Ausschlag, d. h. desto „empfindlicher" ist das Instrument für Druckdifferenzen, desto leichter entstehen aber Entstellungen der Kurve, d. h. desto geringer ist seine „Güte". Denn nur bei ganz langsamen Druckschwankungen verschiebt sich die Flüssigkeit und mit ihr die eigentliche Registriervorrichtung (Spiegel, Schreibhebel oder Schwimmer) nur bis zur Gleichgewichtslage, bei schnellen dagegen gerät diese ganze „wirksame Masse" infolge ihrer Trägheit um den Gleichgewichtspunkt in Schwingungen; die erhaltene Kurve entspricht also nicht mehr der wirklichen Druckschwankung, sondern ist durch die Eigenschwingungen des Manometers entstellt, und um so mehr entstellt, je träger diese Eigenschwingungen sind.

Eine exakte Analyse der Beziehungen, die zwischen den verschiedenen statischen und dynamischen Konstanten der Instrumente und ihrer Güte

[1]) Eine ausführliche kritische Darstellung und Literaturangabe findet sich von *O. Frank* im Handbuch der physiologischen Methodik (Leipzig, S. Hirzel. 1911). Bd. 2. IV. Abteilung.

[2]) Luftmanometer sind ihrer großen Fehlerquellen wegen verlassen.

bestehen, verdanken wir den experimentellen Untersuchungen *Ficks*[1]), *Hürthles*[2]) und neuerdings namentlich den eingehenden theoretisch-experimentellen Arbeiten *O. Franks*.[3]) *Frank* kam bei seiner Analyse zu dem Resultat, daß bei den schnellen Druckschwankungen des Kreislaufes neben einer genügenden Empfindlichkeit des Instrumentes vor allem eine hohe Zahl der Eigenschwingungen für die Güte eines Manometers maßgebend ist, und zwar aus folgenden Gründen: das Schädigende für die Druckregistrierung sind die Trägheitskräfte des Manometersystems; sie sind abhängig von der Größe der „wirksamen Masse". Diese Größe läßt sich — nach *Frank* — nun nicht nur berechnen, sondern auch experimentell messen durch Bestimmung der Schnelligkeit der Eigenschwingung: je größer die Zahl der Schwingungen in der Zeiteinheit ist, desto kleiner ist die wirksame Masse, desto kleiner die zur Geltung kommenden Trägheitskräfte, um so genauer folgt also das Manometer den zu messenden Druckschwankungen und umgekehrt kann man aus einer kleinen Schwingungszahl auf eine geringe Güte des Manometers schließen. Die Verbesserungsbestrebungen *Franks* gingen deshalb in erster Linie darauf hinaus, die wirksame Masse soweit zu verkleinern, daß bei möglichst hoher Schwingungszahl eine möglichst geringe dynamische Entstellung der Kurve resultierte.[4])

Im folgenden soll der historischen Entwicklung gemäß zuerst das Quecksilbermanometer und dann das Gummi- und Federmanometer behandelt werden, zuletzt sollen an Kurvenbildern, die gleichzeitig mit beiden Manometern aufgenommen sind, die theoretisch entwickelten Leistungsdifferenzen auch experimentell veranschaulicht werden.

Quecksilber-Manometer.

Das älteste und auch heute noch gebräuchlichste Blutdruckmanometer ist das *Ludwig*sche Quecksilbermanometer; es besteht aus einer U-förmig gebogenen Röhre von 0·5 *cm* Durchmesser, das zur Hälfte mit Hg gefüllt

[1]) *Fick*, Ein neuer Wellenzeichner. Ges. Schriften. III. S. 593 und 608. 1877.

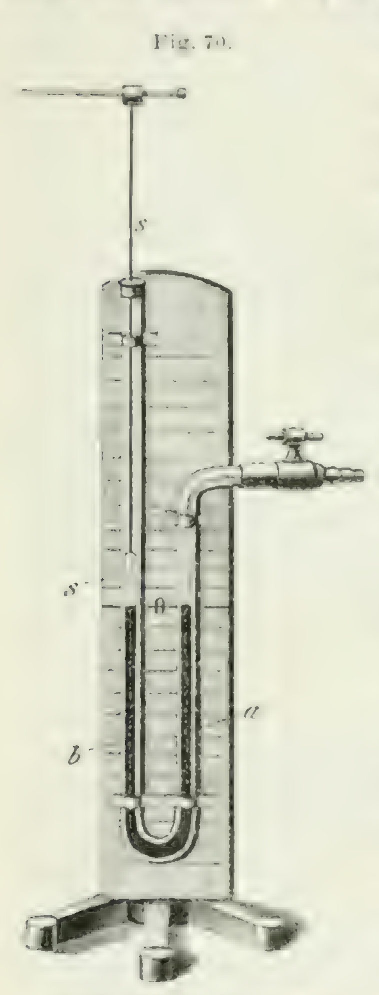
[2]) *Hürthle*, Beiträge zur Hämodynamik. *Pflügers* Archiv. **43**. S. 399. 1888; **47**. S. 1. 1890; **49**. S. 29. 1891; **55**. S. 319. 1893. — Über die Leistung des Tonographen. Ibid. **82**. S. 515 1900.

[3]) *O. Frank*, Kritik der elastischen Manometer. Zeitschr. f. Biologie. **44**. S. 445. 1904. — Theorie des Kolbenmanometers. Ibid. **45**. S. 465. 1904. — Der Puls in den Arterien. Ibid. **46**. S. 441. 1905. — Statik der Membranmanometer und der Lufttransmission. Ibid. **48**. S. 489. 1906. — Dynamik der Membranmanometer und der Lufttransmission. Ibid. **50**. S. 309. 1908.

[4]) Auf die experimentellen und theoretischen Einwände, die neuerdings von *Hürthle* und *Schäfer* (*Hürthle*, Betrachtungen über die theoretischen und praktischen Bestrebungen, Instrumente zur Registrierung der im Kreislauf auftretenden Druckschwankungen herzustellen etc.; *Pflügers* Archiv. **137**. S. 145 ff.; *Cl. Schäfer*, Kritische Randglossen zu den theoretischen Untersuchungen von *O. Frank* über Manometer. Ibid. **137**. S. 250, 1910) gegen die *Frank*sche Theorie erhoben worden sind, haben wir hier keine Veranlassung einzugehen, da ihre Aussetzungen sich auf Unterschiede der Güte der Manometer beziehen, die für das praktische Bedürfnis nicht mehr in Betracht kommen, für welches diese Zeilen geschrieben sind.

ist. Der eine Schenkel des Rohres ist mit Flüssigkeit gefüllt und durch eine starre Röhre (Bleirohr) luftblasenfrei mit der Arterienkanüle des Versuchstieres verbunden. Die andere Manometerröhre ist offen; auf der Hg-Kuppe dieser Seite sitzt ein „Schwimmer" *(s)* aus Stahl oder Aluminium, der durch einen übergezogenen Gummischlauch am Einsinken in das Quecksilber gehindert wird und allen Schwankungen des Quecksilbers folgt. Dieser Schwimmer schreibt mit einer am oberen Ende befindlichen Spitze die Schwankungen der Hg-Säule auf berußtes Papier oder mittels einer Tintenfeder auf weißes Papier; durch einen herabhängenden, leicht beschwerten Faden wird der Schreiber an das Kymographion angedrückt. Um die Verbindung zwischen Arterie und Manometer herzustellen, füllt man zunächst mit einer Spritze, die durch einen Dreiweghahn einerseits mit dem Manometer, andrerseits mit dem Bleirohr in Verbindung steht, letzteres luftfrei mit gerinnungshemmender Flüssigkeit; dann setzt man das Manometer unter einen gewissen Überdruck, der etwas geringer sein soll als der zu erwartende mittlere Blutdruck, verbindet Bleirohr und Arterienkanüle durch einen kurzen Gummischlauch und öffnet zuletzt den Hahn zwischen Manometer und Bleirohr.

Fig. 70.



Registrierende Quecksilbermanometer ¹/₅.

Um nach einem Experiment die Blutdruckhöhen zu messen, löst man die Kanüle aus der Arterie und schreibt nun die Abszissenlinie auf; von dieser Null-Linie aus läßt sich die Höhe des Blutdrucks ohne weiteres mit Zirkel und Maßstab durch Verdoppelung der erhaltenen Werte bestimmen. Zur Auszählung der Pulszahl trägt man aus der Zeitschreibung die Strecke für 10—30 Sekunden in die Pulskurve ein und zählt mehrere solcher Strecken durch.

Nach den obigen Auseinandersetzungen kann das Quecksilbermanometer nur als ein Instrument sehr geringer Güte betrachtet werden, weil es wegen seiner großen wirksamen Masse eine außerordentlich kleine Schwingungszahl hat (ca. 1mal in 1 Sekunde); und doch kann man ihm wegen der Bequemlichkeit der Handhabung die Brauchbarkeit nicht absprechen, allerdings unter der Voraussetzung, daß man sich über die Beschränkung seiner Leistungsfähigkeit klar bleibt.

Die Folge nämlich der erwähnten langsamen Schwingungen, d. h. der großen Trägheit der wirksamen Masse muß die sein, daß alle schnellen Druckschwankungen, besonders die der einzelnen Pulse, unrichtig wiedergegeben werden, und zwar meist zu klein, daß langsamere Druckschwankungen, also z. B. die Atemschwankungen oder Vaguspulse zwar richtiger,

aber oft noch durch Interferenz der Eigenschwingungen entstellt zu hoch oder zu niedrig ausfallen können, so daß die resultierende Kurve nur als eine angenähert richtige Wiedergabe des mittleren Blutdruckes betrachtet werden darf.

Aber auf die Messung dieses mittleren Blutdrucks kommt es ja bei biochemischen Arbeiten hauptsächlich an, wenn von einer Substanz ein Einfluß auf die Höhe des Blutdrucks festgestellt werden soll.

Der für die praktische Verwendung nicht zu unterschätzende Vorteil dieses Manometers ist der, daß seine Empfindlichkeit, wenn man für Reinheit des Quecksilbers sorgt, fast unverändert[1]) bleibt, daß es keiner Aichung bedarf, daß man vielmehr von der Abszissenlinie aus die Druckhöhe direkt mit dem Zentimetermaß abmessen kann[2]), endlich daß bei zwei übereinander geschriebenen Kurven die Punkte gleicher Zeitmomente stets in derselben Ordinate liegen.

Die Leistungsfähigkeit des Quecksilbermanometers ist nach dem Gesagten nur eine recht beschränkte, sie versagt ganz, wo schnellere Druckschwankungen aufgeschrieben werden sollen, so daß es nur zu einer Andeutung der einzelnen Pulse kommt: aber auch bei langsameren Druckschwankungen können durch Interferenz beträchtliche Entstellungen selbst des mittleren Blutdrucks entstehen. Schon *Marey* hat deshalb durch Dämpfung, d. h. durch Einschaltung eines Reibungswiderstandes an irgend einer Stelle zwischen Arterie und Manometer eine Verbesserung des Hg-Manometers versucht; in der Tat gelingt es durch vorsichtige Benutzung dieses Hilfsmittels, die Wirkung der Eigenschwingung fast ganz zu beseitigen. Die erhaltenen Kurven entsprechen nach der heutigen Anschauung ziemlich genau dem mittleren Blutdruck.[3]) Man bringt zu diesem Zwecke, z. B. an der Schlauchverbindung zwischen Arterienkanüle und Verbindungsrohr, eine Schraubklemme an und zieht sie vorsichtig so weit an, daß die Atemschwankungen fast verschwinden und die Pulsschwankungen noch eben notiert werden. Zieht man die Schraube noch stärker an, so verschwinden auch diese und die Notierung des mittleren Blutdrucks ist natürlich noch etwas genauer; doch dürfte dies kein Vorteil gegenüber dem Verlust der Pulsaufzeichnung sein. Ein Nachteil dieser Dämpfung macht sich aber bei größeren Schwankungen des mittleren Blutdrucks geltend: durch die schmale Dämpfungsöffnung gleicht sich nämlich der Druck durch Flüssigkeitsverschiebung nur so langsam aus, daß die Kurve zeitlich immer etwas hinter der wahren Druckschwankung zurückbleiben und die wahre Größe einer Schwankung um so kleiner angeben wird, je schneller diese zur Norm zurückkehrt (vgl. Kurve III, S. 138).

---

[1]) *Hürthle, Sachs* und *Riemann*, Vergleich des mittleren Blutdrucks in Karotis und Kruralis. *Pflügers* Archiv. CX. S. 421. 1905.

[2]) Natürlich unter Verdopplung der erhaltenen Werte.

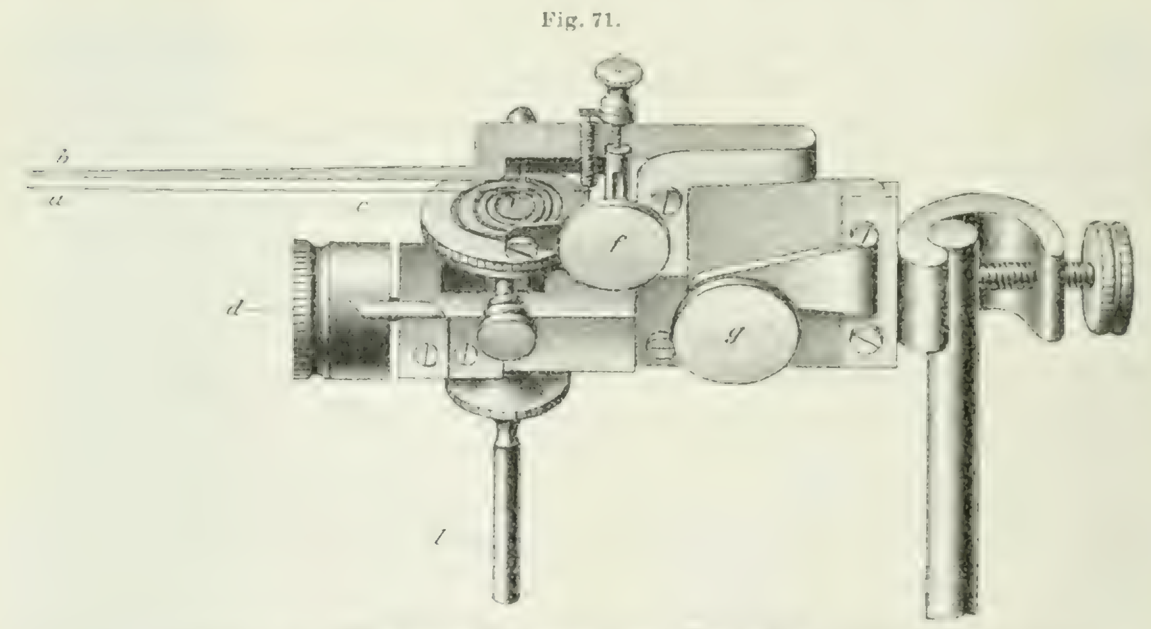
[3]) *Frank*, loc. cit. — *v. Kries*, Über die Bestimmung des Mitteldrucks durch das Quecksilbermanometer. *Du Bois-Reymonds* Archiv f. Physiol. 1878. S. 419.

Elastische Manometer.

Wie man sieht, verzichtet man bei Benutzung des Quecksilbermanometers auf eine genaue Schreibung von Form und Verlauf jedes einzelnen Pulsdruckes wie der Atemschwankungen: stellt man die Forderung, auch diese richtig darzustellen, so muß man ein Manometer mit kleinerer wirksamer Masse benutzen, deren Trägheit so gering ist, daß ihre Eigenbewegungen den wahren Druckablauf nur unmerklich entstellen.

Eine solche Leistungsfähigkeit besitzen die elastischen Manometer; bei ihnen wird die Elastizität von Gummi, von Metall oder einer kleinen Luftblase als Gegenkräfte benutzt. *Fick*[1]) war (1877) der erste, der im Federmanometer ein solches Instrument konstruierte; auf seinen genaueren Bau wollen wir hier nicht eingehen, da es in der alten Form verlassen ist und in seinen Prinzipien weiter unten beim *Frank*schen Federmanometer beschrieben werden wird. Zuvor sollen vielmehr die in den meisten Labora-

Fig. 71.



Elastisches Manometer, nach *Hürthle-Gad*.
c die elastische Membran, *a* die Schreibfeder, *b* Schreiber der Nullinie, *l* Leitungsrohr zu dem Blutgefäß.

torien heute gebrauchten Manometer von *Hürthle*[2]) (Tonometer 1888) und *Gad-Cowl*[3, 4]) (1890) besprochen werden. Beim *Hürthle*schen Tonometer ist eine kleine mit Wasser gefüllte Manometerkapsel verschlossen durch eine straff gespannte Gummimembran von nur 7 *mm* Durchmesser (oder noch weniger); die Manometerkapsel ist durch eine möglichst kurze wassergefüllte Röhre mit der Arterie verbunden. Die auch bei hohen Drucken nur sehr geringen Ausbuchtungen der Gummimembran werden mittels eines Hebels vergrößert aufgeschrieben; im *Gad-Cowl*schen Apparat ist an die Stelle der Gummimembran eine kleine, kreisförmig gewellte Blechplatte

[1]) *Fick*, Ein neuer Wellenzeichner. Ges. Schriften. III. 593. 1877.
[2]) *Hürthle*, Beiträge zur Hämodynamik. *Pflügers* Archiv. 43. S. 399.
[3]) *Gad*, Zentralbl. f. Physiol. 1889. S. 318.
[4]) *Cowl*, Über Blutwellenzeichner. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1890. S. 564.

gesetzt. Gegenüber dem Quecksilbermanometer bedeuteten diese Instrumente einen großen Fortschritt: konnte man doch mit ihnen die großen Druckschwankungen feststellen, die durch jede Herzkontraktion im Gefäßsystem hervorgerufen werden, den sogenannten Pulsdruck, den man nach den Erfahrungen am Hg-Manometer nur für relativ unbedeutend gehalten hatte.

Neuerdings sind nun diese Verbesserungsbestrebungen weiterhin ganz bedeutend gefördert worden durch die Arbeiten *Franks*. Zur weiteren Verringerung der wirksamen Masse setzte er im optischen Manometer[1]) an Stelle der Hebelschreibung eine Spiegelvorrichtung, welche die Exkursionen einer Gummimembran durch Ablenkung eines Lichtstrahls photographisch zu registrieren erlaubt. Da diese Spiegelschreibung als fast masselos zu betrachten ist und auch eine weitere Verkleinerung der wirksamen Masse durch geeignetere Konstruktion der Röhren und der Manometerkapsel erzielt wurde, so konnte eine Schwingungszahl des Instrumentes von 180 Sek. erreicht werden: mit einer so geringen Trägheit dürfte dies Manometer allen Druckschwankungen des Kreislaufes gerecht werden: seine Güte ist etwa 1800mal größer als die des Hg-Manometers.

Vorzügliche Resultate scheinen auch *Bayliss* und *Starling*[2]) mit der Photographie der Volumschwankungen einer kleinen in einer Glaskapillare eingeschlossenen Luftblase gehabt zu haben: die Kapillare ist auf der einen Seite geschlossen, auf der anderen Seite mit der Arterie durch wassergefüllte Röhren verbunden.

Die Benutzung dieser letzteren Modelle ist jedoch zu umständlich, als daß sie für den praktischen Gebrauch in Betracht käme: unter Verzicht auf eine solche extreme Güte hat deshalb *Frank* neuerdings ein Federmanometer[3]) konstruiert, dessen Schwingungszahl 50 Sek. beträgt und das bei einer Empfindlichkeit von 1 *cm* Hebelausschlag pro 100 *mm* Hg-Druck noch immer 500mal besser ist als das Quecksilbermanometer. Es hat praktisch den großen Vorteil der Hebelschreibung auf berußtem Papier, so daß seine Handhabung eine relativ sehr einfache ist. Seine Güte reicht, wie Vergleiche mit dem weit besseren optischen Manometer ergeben haben, durchaus hin, um die Pulsschwankungen mit genügender Treue aufzuzeichnen. Als Typus eines elastischen Manometers sei es hier ausführlicher besprochen.

In der Konstruktion schließt es sich an das von *A. Fick*[4]) (1877) angegebene, von *Hürthle*[5]) modifizierte Federmanometer an, seine einzelnen Teile sind jedoch auf Grund der theoretischen Überlegungen von *Frank* so gebaut, daß wohl eine für diese Konstruktion maximale Güte erreicht ist. Die Anordnung ist folgende (vergl. Fig. 72): Von der Arterie führt eine Metallkanüle, die durch einen Hahn verschließbar ist, vermittelst eines fest anschraubbaren Metallkonus an eine 1·3 *cm* weite, winklig gebogene Glas-

[1]) *Frank*, Ein neues Spiegelmanometer von höchster Güte. Zeitschr. f. Biol. **53**. 545, 1910.

[2]) *Bayliss* und *Starling*, Internat. Monatsschr. f. Anat. u. Physiol. **11**. S. 426.

[3]) *Frank* und *Petter*, Ein neues Federmanometer. Zeitschr. f. Biol. **54**. 1910.

[4]) loc. cit.

[5]) *K. Hürthle*, Beiträge zur Hämodynamik. *Pflügers* Archiv. **43**. S. 399. 1888.

röhre, an deren Ende sich die Manometerkapsel befindet; ihre 0·9 *cm* weite Öffnung ist von einer Gummimembran mittlerer Spannung verschlossen; die Röhre selbst ist luftfrei mit ausgekochtem Wasser gefüllt. Auf der Gummimembran liegt von außen eine Pelotte auf, die durch eine Stahlfeder fest angedrückt wird; die Feder ist an ihrem anderen Ende festgeklemmt und kann durch eine Schraube *(a)* in ihrer Spannung verändert werden. Die Bewegungen der Feder werden durch einen kleinen besonders konstruierten Schreibhebel auf berußtes Papier aufgeschrieben.

Die Druckschwankungen im Arterienrohr pflanzen sich also durch die inkompressible Flüssigkeit fort und bewirken durch geringfügige Verschiebung der Flüssigkeit (pro 100 *mm* Hg = 0·6 *mm*³) eine Ausbuchtung der Gummimembran und damit eine geringe Durchbiegung der Feder, deren Wert von dem Hebel aufgeschrieben wird; man gibt der Feder von Anfang an eine solche Spannung, daß der Ausschlag des Hebels für 100 *mm* Hg = 1 *cm* ist. Die elastische Gegenkraft wird bei dieser Konstruktion im wesentlichen (bis 90%) durch die Feder geleistet, nur zum geringen Teil von der Gummimembran, die hauptsächlich abdichtende Funktion hat. Vor dem einfachen Gummimanometer (Tonograph, *Hürthle* 1888) hat dieses Federmanometer deshalb den Vorzug der gleichmäßigen Empfindlichkeit, so daß man nicht gezwungen ist, vor und nach jedem Versuch eine Aichung vorzunehmen.

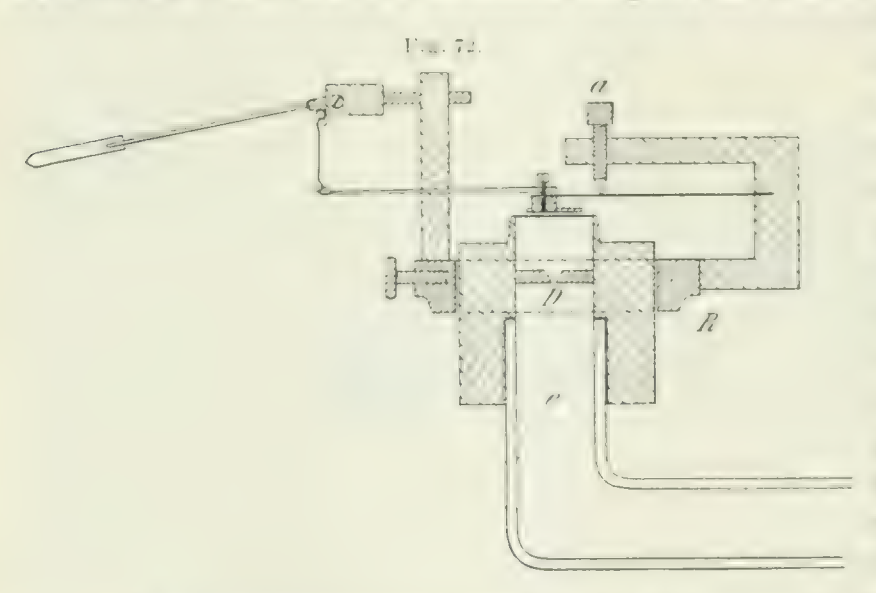


Fig. 72.

Kopf des Federmanometers (nach *Frank* und *Petter*).

Die Aichung des Instrumentes geschieht so, daß man zunächst die Abszisse feststellt durch Lösen der Arterienkanüle; dann verbindet man diese Kanüle mit einem Gummischlauch, der sich gabelnd zu einem graduierten Hg-Manometer und einer genügend großen luftdichten Spritze oder einem mit Luft gefüllten Gummiballon führt. Durch Einpressen von Luft erhöht man sukzessive den Druck und markiert die Hebelstellung bei verschiedenen Drucken. Ist die Empfindlichkeit des Federmanometers richtig eingestellt, so entspricht 1 *mm* Höhe = 10 *mm* Hg-Druck.

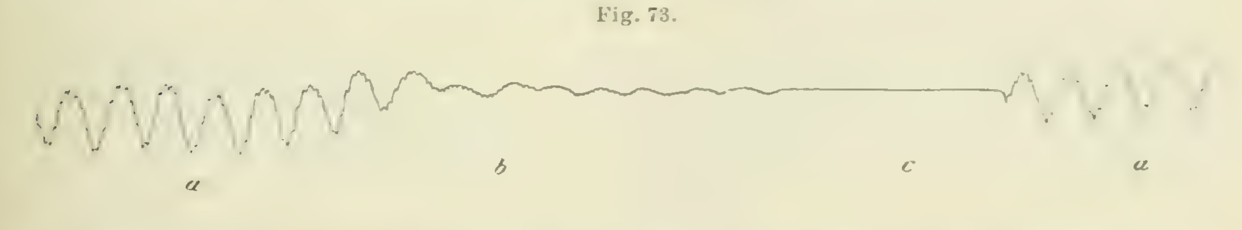
Daß für den praktischen Gebrauch den Vorteilen einer genauen Registrierung Nachteile einer gewissen Umständlichkeit der Handhabung gegenüber stehen, kann nicht weiter wundernehmen. Ganz besonders peinlich ist auf die Fernhaltung von Luftblasen Wert zu legen; sie setzen die Güte des Manometers stark herab.

Die Beurteilung der Druckschwankungen auf den Kurven ist fernerhin nicht so leicht wie bei denen des Hg-Manometers, da kleine Druckdifferenzen wegen des geringen Ausmaßes nicht so sinnfällig hervortreten. Zur genauen Ausmessung der Kurven wird man eines Kurvenanalysators[1]) nicht entbehren können: es ist dies ein pultförmiger Apparat, auf dem die Kurve befestigt wird. An ihm sind beweglich zwei Maßstäbe angebracht, die mit einer Lupe und Schrauben scharf auf die Kurve eingestellt werden: auf diese Weise können alle Dimensionen genau ausgemessen werden.

Zum Schlusse seien zum Vergleich der Leistungsfähigkeit des Quecksilber- und Federmanometers noch einige Kurven besprochen, die mit beiden Instrumenten gleichzeitig geschrieben sind: besser als Worte werden diese Bilder die wesentlichsten Unterschiede ihrer Güte zeigen können.

Die Kurven sind in der Weise gewonnen, daß die Karotis eines Kaninchens (Urethannarkose) durch eine T-förmige Arterienkanüle einerseits mit einem Hg-Manometer, andererseits mit einem *Frank*schen Federmanometer verbunden wurde und die Schreiber beider Instrumente möglichst genau übereinander an ein Kymographion angelegt wurden: beide Manometer schreiben also von derselben „Verkoppelungsstelle“. Alle Kurven sind von links nach rechts zu lesen; Zeit in $^1/_5$ Sekunde.

Fig. 73.



Kurve I (Fig. 73). Normale Blutdruckkurve; Hg-Manometer (oben): a = ungedämpft, b = gedämpft, c = ausgeschaltet. Die großen Schwankungen des ungedämpften Manometers rühren von der Atemrhythmik her; auf sie setzen sich die kleinen, oft schlecht erkennbaren Pulsschwankungen. Nach der Dämpfung verschwinden die Atemschwankungen fast ganz. Auch die Pulse sind beträchtlich kleiner, treten aber noch deutlich und gleichmäßig hervor.

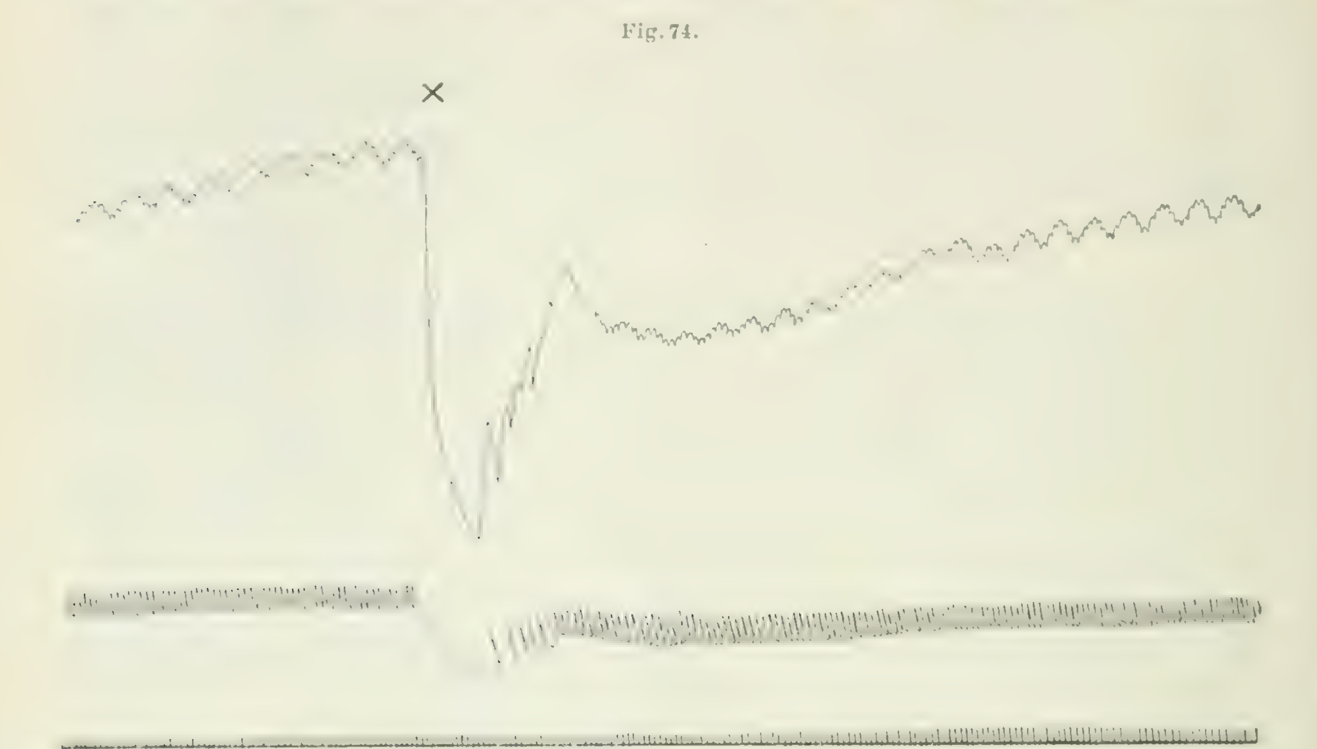
Federmanometer (unten): Die Druckschwankung bei jedem einzelnen Pulse (Pulsdruck) ist als etwa 20—30mal größer aufgezeichnet als durch das Hg-Manometer (11 *mm* dieser Kurve = ca. 100 *mm* der Hg-Kurve); auch die Form der einzelnen Druckschwankung ist deutlich zu erkennen. Die Atemschwankungen der Kurve erscheinen nach Dämpfung und Ausschaltung des Hg-Manometers (b und c) größer als während der ungedämpften Schwingungen (a), und zwar wegen der Ausschaltung der Rückwirkung von Eigenschwingungen des Quecksilbers auf die Blutdruckwellen an der Verkoppelungsstelle.

Kurve II (Fig. 74). Reizung des rechten Vagus mit Induktionsstrom (X); oben: ungedämpftes Quecksilbermanometer; unten: Federmanometer.

[1]) *Jaquet*, Studien über graphische Zeitregistrierung. Zeitschr. f. Biol. 1890. XXVIII. S. 35.

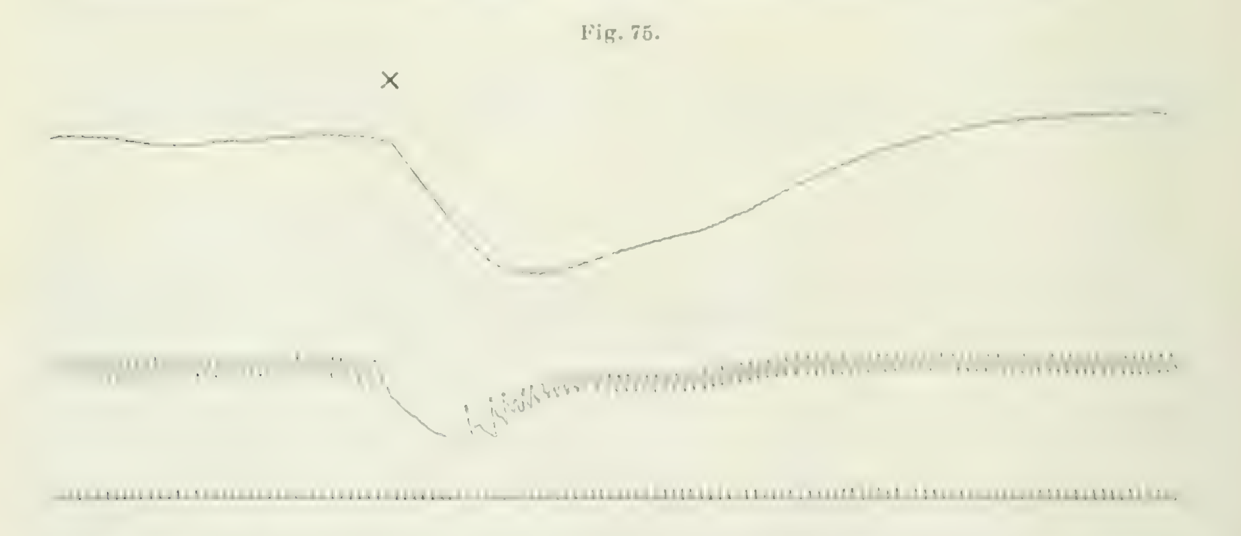
Aus dem Vergleich der Vaguspulse oben und unten geht klar hervor, daß die Form des einzelnen Pulses beim Hg-Manometer nicht durch den wahren Druckablauf,

Fig. 74.



sondern im wesentlichen durch die Trägheit der Eigenschwingung des Instrumentes und die Schnelligkeit der Pulsfolge bestimmt wird. Der Puls erscheint verhältnismäßig groß und zu breit bei langsamer Schlagfolge, zu klein bei schneller. Die Größe der maximalen Druckschwankung ist durch das Hg-Manometer ziemlich richtig wiedergegeben.

Fig. 75.



Kurve III (Fig. 75). Vagusreizung (×); oben: gedämpftes Quecksilbermanometer; unten: Federmanometer. Kleinen und langsamen Druckschwankungen folgt das gedämpfte Hg-Manometer mit genügender Treue, bei großen Schwankungen dagegen bleibt die Kurve infolge der starken Reibung in der engen Dämpfungsstelle hinter dem wahren Druckablauf zurück: sie erreicht den tiefsten Punkt später als das Federmanometer und steigt langsamer an als dieses. Die Größe der Blutdruckschwankung wird zudem ganz falsch wiedergegeben: nach der Quecksilberkurve scheint sie nur ca. $^1/_3$ des Wertes zu betragen, den sie nach der Aufschreibung durch das Federmanometer tatsächlich erreicht hat.

Methoden zur Aufarbeitung des Blutes in seine einzelnen Bestandteile.

Von **E. Letsche**, Tübingen.

Die äußere Beschaffenheit des Blutes und die Beobachtung, daß es bei ruhigem Stehen und nicht eintretender Gerinnung sich trennt in eine klare, schwachgelb gefärbte Lösung und ein gefärbtes Sediment, lassen es für viele Zwecke geraten erscheinen, diese beiden Teile getrennt für sich zu untersuchen. Da aber das Blut ja je nach den Umständen — Tierart, Temperatur, Sauerstoff- und Kohlensäuregehalt usf. — nach dem Verlassen der Gefäße rascher oder langsamer gerinnt, so ist die Aufgabe, die beiden Teile getrennt für sich zu erhalten, keine ganz einfache.

Als Einleitung gewissermaßen ist deshalb zu behandeln:

I. Beschreibung der Methoden zur Gewinnung von Plasma, Serum und Formelementen.

Hieran schließen sich:

II. Methoden zur Bestimmung des relativen Volumens bzw. Gewichts von Formelementen und Plasma bzw. Serum.

III. Trockensubstanzbestimmung; Nachweis und Bestimmung von Ammoniak, Kohlensäure und Aschenbestandteilen.

IV. Methoden zur Untersuchung des Plasmas und Serums[1] auf einzelne Bestandteile.

V. Untersuchung der Formelemente auf einzelne Bestandteile.

VI. Verfahren zur Bestimmung verschiedener Bestandteile in einer Blutportion.

VII. Bestimmung der Verteilung einzelner Bestandteile auf Serum und Formelemente.

I. Gewinnung von Plasma, Serum und Formelementen.

1. Plasma.

Reines Plasma von Säugetierblut ohne irgend welchen Zusatz zu erhalten, gelingt nur bei Blutarten, die, wie z. B. Pferdeblut, sehr langsam gerinnen und deren Formelemente genügend rasch sich absetzen.

[1]) Es sind in diesem Abschnitte auch Methoden mit aufgenommen, die dazu dienen, das Blut als Ganzes auf gewisse Bestandteile, für deren Isolierung, Nachweis und Bestimmung im Plasma bzw. Serum besondere Methoden nicht ausgearbeitet sind, zu untersuchen.

Man läßt in diesem Falle das Blut direkt aus einem Gefäß in einen nicht zu weiten, stark abgekühlten Glaszylinder einfließen und füllt den Zylinder möglichst vollständig mit Blut an, um zu verhüten, daß Wasser an den oberen Teilen des Zylinders sich kondensiert, die gebildeten Tropfen in das Blut zurückfließen und dadurch die Auflösung geringer Mengen Blutkörperchen bewirken. An einem kühlen Ort, möglichst bei 0°, läßt man den Zylinder ruhig stehen; dabei setzen die Blutkörperchen sich zu Boden und das Plasma steht als klare, leicht abhebbare Schicht über dem Sediment.

Das Blut der meisten übrigen Wirbeltiere gerinnt, soweit darüber Untersuchungen angestellt worden sind, selbst beim Abkühlen und bei Einhaltung gleich nachher zu erwähnender Vorkehrungen zu rasch, als daß es gelingen könnte, Plasma und Formelemente zu trennen.

Wohl aber gelingt dies bei dem Blut von Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen, wie *Delezenne*[1]) gezeigt hat. Sein Verfahren ist folgendes[2]):

Eine peinlich saubere Kanüle (ausgekocht) führt man in die Karotis eines Vogels (Truthenne, Gans, Ente verwendete *Delezenne*) ein; mit ihrer Hilfe fängt man das Blut, das man peinlich vor der Berührung mit der Wunde schützen muß, direkt in einem Zentrifugenglas auf. Die gereinigten Zentrifugengläser werden mit destilliertem Wasser ausgekocht und vor Staub geschützt aufbewahrt. Mit Hilfe der Zentrifuge (*Delezenne* verwendet eine solche von *Fr. Runne*, Heidelberg, die 2400—2600 Touren in der Minute macht) trennt man Plasma und Formelemente. In der Regel genügt 10 Minuten langes Ausschleudern, doch läßt man die Zentrifuge zweckmäßig jedesmal ½ Stunde gehen. Man hebt das Plasma vorsichtig ab und zentrifugiert nochmals ½ Stunde; Abheben und Zentrifugieren wiederholt man mindestens zweimal. Nur auf diese Weise erhält man etwa im Laufe von 2 Stunden ein Plasma, das vollkommen frei von zelligen Elementen (vor allem Blutplättchen) ist.

Schützt man das zuletzt abgehobene Plasma durch mehrere Papierschichten vor Staubteilchen und Keimen aus der Luft, so bleibt das Plasma bei einer Temperatur von 7—16° über einen Monat flüssig.

Bei allen übrigen Blutarten muß man sich damit begnügen, ein Plasma zu erhalten, das durch bestimmte Zusätze ungerinnbar gemacht worden ist.

Die gerinnungshemmende Wirkung von Peptonlösungen[3]), die in die Blutbahn injiziert wurden, ist zur Gewinnung größerer Plasmaquanti-

[1]) *C. Delezenne*, Aperçu général sur la coagulation du sang chez les vertébrés. Compt. Rend. de la Soc. de Biol. 49. 507 (1897).

[2]) *C. Delezenne*, Recherches sur la coagulation du sang chez les oiseaux. Archiv de Physiol. V. 9. 347/52 (1897).

[3]) *A. Schmidt*-Mühlheim, Beiträge zur Kenntnis des Peptons und seiner physiologischen Bedeutung. Arch. f. Anat. u. Physiol., 1880. (Physiol. Abt.) 33/56. *Fano*, Verhalten des Peptons und Tryptons gegen Blut und Lymphe. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1881. (Physiol. Abt.) 277/96.

täten für chemische Untersuchungen bis jetzt nur wenig verwendet worden. Ebenso hat man bis jetzt die von *Haycraft*[1]) beobachtete Wirkung von Blutegelextrakt für diese Zwecke, soweit ich sehe, nur wenig angewandt, trotzdem es auf Grund der Arbeiten von *Fr. Franz*[2]) und von *A. Bodong*[3]) möglich ist, Hirudin in reiner und leicht dosierbarer Form zu gewinnen.[4])

Schittenhelm und *Bodong*[5]) verfahren zur Gewinnung von Hirudinplasma folgendermaßen:

Man stellt eine Lösung von beispielsweise 40 *mg* Hirudin in physiologischer Kochsalzlösung (5—10 cm^3) her und läßt in diese das Blut z. B. aus der Karotis eines Hundes einfließen. Man läßt soviel Blut zufließen, daß auf 1 cm^3 Blut etwa 0·1 *mg* Hirudin kommt — in unserem Falle also 400 cm^3 Blut.

Dieses Blut bleibt tagelang ungeronnen, und es wird mit Hilfe dieses Verfahrens wohl auch möglich sein, noch größere Quantitäten Blut, als *Schittenhelm* und *Bodong* sie verwendeten, ungerinnbar zu machen und in der üblichen Weise zur Gewinnung von Plasma zu verwerten.

Die Mittel, die gegenwärtig beinahe ausschließlich Verwendung finden, wenn es sich darum handelt, größere Plasmamengen zu gewinnen, sind Oxalate und Fluoride.

Daneben finden in ganz untergeordneter Weise auch noch andere Substanzen, z. B. Natriumzitrat, Natriummetaphosphat, $MgSO_4$, und andere Neutralsalze Verwendung. Von Magnesiumsulfat z. B. wendet man auf ein Volumen gesättigter Lösung am besten 3 Volumina Blut an und mischt möglichst gut und rasch.

Durch die große Magnesiumsulfatmenge wird natürlich der osmotische Druck des Plasmas gegenüber den Blutkörperchen enorm erhöht; die Folge ist zumindest ein reichlicher Austritt von Wasser aus den Formelementen und man wird demzufolge ein solches Plasma für quantitative Untersuchungen an Plasma oder Formelementen der Änderung der Konzentrationsverhältnisse wegen kaum anwenden können.

Die Anwendung von Oxalaten und Fluoriden der Alkalimetalle und des Ammoniums begegnet, abgesehen von ihrer kalkfällenden Wirkung, keinen prinzipiellen Bedenken und bringt auch nicht die bei Anwendung von Neutralsalzen, wie Magnesiumsulfat, oft recht störenden Unannehmlichkeiten der Verarbeitung außerordentlich stark salzhaltiger Lösungen mit sich.

---

[1]) *J. B. Haycraft*, Über die Einwirkung eines Sekretes des offizinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 18. 208/17 (1884).

[2]) *Fr. Franz*, Über den die Blutgerinnung aufhebenden Bestandteil des medizinischen Blutegels. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **49**. 342/66 (1903).

[3]) *A. Bodong*, Über Hirudin. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 52. 242/61 (1905).

[4]) Das Hirudin wird von der Firma *E. Sachsse & Comp.* in Leipzig fabrikmäßig hergestellt.

[5]) *A. Schittenhelm* u. *A. Bodong*, Beiträge zur Frage der Blutgerinnung mit besonderer Berücksichtigung der Hirudinwirkung. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 54. 217/44. S. 241 (1906).

Nach *Arthus* und *Pagès*[1]) verwendet man von Oxalaten soviel, daß die Mischung von Blut und Oxalatlösung schließlich auf 1000 Teile 1 Teil Oxalat enthält.

Man fängt z. B. in 25 *cm*³ Oxalatlösung von 0·9% 225 *cm*³ Blut direkt aus einem Gefäß (ob Arterie oder Vene ist gleichgültig) auf, mischt gut und trennt durch Zentrifugieren.

Anstatt eine etwa 1%ige Lösung zum Auffangen des Blutes zu verwenden, kann man auch konzentriertere Lösungen oder direkt auch festes Salz benutzen. Vor allem in letzterem Falle sorgt man durch gutes Rühren des Gemisches für rasche und vollständige Mischung. Bei Anwendung von festem Salz kann man, um rasch eine vollständige Mischung von Blut und Oxalat zu erreichen, zweckmäßig sich folgenden Kunstgriffes bedienen: Man bringt die für das zu erwartende Blutquantum — z. B. 500 *cm*³ Blut — nötige Menge Kaliumoxalat — in diesem Falle 0·5 *g* — in einen Meßzylinder, gibt die zur Lösung eben nötige Menge warmen Wassers zu und verteilt die Lösung durch Neigen und Drehen des Gefäßes über seine innere Wandung bis zu der Höhe, welche das Blut erreichen wird. Beim Verdunsten des Wassers wird das Oxalat als dünne Schicht die Wandung des Gefäßes gleichmäßig bedecken und es ist dadurch eine raschere Mischung gesichert.

Für die Verwendung von Fluoriden gilt genau das gleiche, nur empfiehlt es sich nach den Angaben von *Arthus* und *Pagès*[1]), auf 1000 Teile Mischung etwa 1·5 *g* Fluorid anzuwenden.

Eine etwas höhere Konzentration des Oxalats oder Fluorids — im ersteren Fall bis zu etwa 0·25%, im letzteren bis zu etwa 0·3% — ist in vielen Fällen ganz zweckmäßig.

2. Serumgewinnung.

Leichter als Plasma ist Serum zu erhalten; frei von Beimengungen, die aus den Formelementen stammen, vor allem frei von Blutfarbstoff erhält man Serum nach folgendem allgemein bekannten und geübten Verfahren: Man fängt das Blut in einem vollkommen trockenen Gefäß, das möglichst auf Körpertemperatur erwärmt ist, auf und läßt das Gefäß samt Inhalt ruhig stehen. Nach einiger Zeit beginnt das Blut zu gerinnen und es bildet sich auf der Oberfläche eine dicke Haut. Diese klebt meist ziemlich fest an der Gefäßwand; mit Hilfe eines Messers löst man sie vorsichtig ab und erreicht auf diese Weise, daß der Blutkuchen sich ganz gleichmäßig zusammenzieht und das Serum vollkommen klar ausgepreßt wird. Ganz frei von Blutfarbstoff erhält man das Serum nur, wenn man während und nach dem Auffangen des Blutes die Bildung von Kondensationswasser unmöglich macht. Dies erreicht man während des Auffangens, wie oben erwähnt, am besten dadurch, daß man das Auffanggefäß auf Körper-

[1]) *M. Arthus* und *C. Pagès*, Nouvelle théorie chimique de la coagulation du sang. Arch. de Physiol. (V.) 2. 739/46 (1890).

temperatur vorwärmt und es möglichst bis zum Rande mit Blut anfüllt. Ist letzteres nicht möglich, so sorge man dafür, daß der nicht mit Blut gefüllte Teil des Gefäßes sich nicht rascher als das Blut abkühlt. Am besten erreicht man dies dadurch, daß man das Gefäß in einem mäßig warmen Raum ruhig stehen läßt.

Das eben geschilderte Verfahren hat neben dem Vorzug, bei sorgfältiger Ausführung ein vollkommen hämoglobinfreies Serum zu liefern, den einen Nachteil, für die Gewinnung größerer Serummengen ziemlich zeitraubend zu sein.

Rascher kommt man zum Ziel, wenn man das Blut sofort, nachdem es den Körper verlassen hat, mit einem Holzstab „schlägt" (kräftig rührt); das Fibrin, das sich an dem Stab als elastisch-faserige zusammenhängende Masse abscheidet, heraushebt und das defibrinierte Blut, nachdem man es zuvor kolliert hat, zentrifugiert. Das über dem Blutkörperchensediment stehende, meist etwas gefärbte Serum hebt man dann mit Hilfe eines Hebers ab, den man an seinem längeren Schenkel zweckmäßig mit einem Kautschukschlauch und einem Quetschhahn versieht, um die Ausflußgeschwindigkeit regulieren und das Abfließen nach Belieben unterbrechen zu können.

Statt durch Schlagen mit einem Holzstab kann man vor allem kleinere Blutmengen auch defibrinieren durch kräftiges Schütteln mit reinem Quecksilber, das Fibrin durch Kollieren abtrennen und dann die Trennung von Serum und Formelementen in üblicher Weise vornehmen.

3. Gewinnung der Formelemente.

a) Rote Blutkörperchen.

Rote Blutkörperchen, denen jedenfalls nur geringe Mengen von Leukozyten und Blutplättchen beigemengt sind, erhält man am besten in folgender Weise[1]):

Frisches Pferdeblut[2]), das mit 0·1% Ammonoxalat ungerinnbar gemacht worden ist, wird bei etwa 3000 Umdrehungen in der Minute etwa 15 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma und die oberste Schicht des Sediments werden abgehoben und die untere feste Blutkörperchenschicht mit 0·9%iger Kochsalzlösung vermischt. Nach erneutem 15 Minuten langem Zentrifugieren wird die abgeschiedene Kochsalzlösung abgehoben und der ganze Prozeß noch 2mal wiederholt.

Für Zwecke, bei denen es darauf ankommt, rote Blutkörperchen vollkommen frei von Leukozyten und Blutplättchen zu erhalten, verfahren *Abderhalden* und *Deetjen* in folgender Weise[3]):

[1]) *E. Abderhalden*, Abbau einiger Polypeptide durch die Blutkörperchen des Pferdes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 51. 334 (1907).

[2]) Ebenso verfährt man natürlich bei jeder anderen Blutart; auch kann man für die Gewinnung von Erythrozyten von defibriniertem Blut ausgehen.

[3]) *E. Abderhalden* und *Deetjen*, Weitere Studien über den Abbau einiger Polypeptide durch die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen des Pferdeblutes. Zeitschrift f. physiol. Chemie. 53. 280 (1907).

Pferdeblut wird durch Zusatz von 0·15% Ammonoxalat ungerinnbar gemacht und zentrifugiert; das Plasma wird abgegossen und die oberste an Leukozyten reiche Schicht des Sediments abgehoben. Das übrige Sediment vermischt man mit einer Lösung von 0·9% Kochsalz und 0·1% Ammonoxalat, zentrifugiert wieder und filtriert nach dem Abheben der Flüssigkeitsschicht das Gemisch der roten Blutkörperchen, Blutplättchen und noch vorhandenen Leukozyten durch eine mehrfache Lage von Filz[1]) auf einer Nutsche. Die Filzschicht durchtränkt man vorher mit Plasma, das man durch Zusatz einiger Tropfen Chlorkalziumlösung zur Gerinnung gebracht hat. Blutplättchen und Leukozyten werden vollständig zurückgehalten. Die Erythrozyten werden nach dem Filtrieren noch 3mal mit Kochsalzlösung verrührt und zentrifugiert.

b) Leukozyten.

Zentrifugiert man ungerinnbar gemachtes Blut, so setzen sich die Leukozyten, als die spezifisch leichteren Formelemente, auf den Erythrozyten ab. Über den Leukozyten findet man bei genügend langem Zentrifugieren eine Schicht von Blutplättchen. Während es nun, wie wir nachher sehen werden, ohne allzu große Schwierigkeiten gelingt, Blutplättchen frei von anderen Beimengungen zu erhalten, bereitet die Gewinnung von Leukozyten aus Blut bis jetzt unüberwindliche Schwierigkeiten, wenigstens soweit es sich um Mengen handelt, die für chemische Untersuchungen ausreichen. Untersuchungen, die sich mit der Zusammensetzung der Leukozyten beschäftigen, sind angestellt worden an Leukozyten aus Eiter und aus lymphatischen Organen.

c) Blutplättchen.

Zur Gewinnung dieser Elemente verfährt *Mosen*[2]) folgendermaßen:

Man läßt das Blut direkt aus der Karotis oder Jugularis in einen Maßzylinder fließen, der je nach der zu erwartenden Blutmenge ein gewisses Quantum einer 2%igen Ammonoxalatlösung in 0·7%iger Kochsalzlösung enthält. Sobald die Mischung das 10fache des angewandten Volums Ammonoxalatlösung erreicht (also 0·2% Ammonoxalat enthält), bringt man sie auf die Zentrifuge und schleudert aus, bis eine Trennung der verschiedenen Bestandteile des Blutes nach ihrem spezifischen Gewicht erreicht ist (2 bis 7 Stunden). Das Blut zeigt dann in der Regel eine 4fache Schichtung. Über den roten Blutkörperchen findet man eine je nach der Blutmenge bis 5 *mm* dicke graurötliche Lage, die neben vorwiegend Leukozyten reich-

[1]) Noch besser erreicht man den gewünschten Zweck durch Filtrieren durch eine längere nicht zu fest gepreßte Watteschicht; *Abderhalden* und *Manwaring*, Über den Abbau einiger Polypeptide durch die roten Blutkörperchen und die Blutplättchen des Rindes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 55. 377 (1908) verwenden eine 25 *cm* hohe Watteschicht.

[2]) *R. Mosen*, Die Herstellung wägbarer Mengen von Blutplättchen. Arch. f. Anat. u. Phys. 1893. (Phys. Abteil.) 352.

lich Erythrozyten und etwas Blutplättchen enthält. Darüber folgt, wie eine zarte Decke, eine weißliche Schicht, die von Erythrozyten und Leukozyten vollkommen frei ist und aus den gewünschten Plättchen besteht. Mit Hilfe einer kleinen Saugpipette kann man diese Schicht leicht abheben.

Morawitz[1]) wendet zu einer vollständigen Abtrennung der Blutplättchen fraktioniertes Zentrifugieren an.

Aus der Karotis eines Tieres entnimmt man Blut und fängt es in Fluornatrium oder Natriummetaphosphatlösung auf, so daß die Konzentration an diesen Zusätzen 0·2 bzw. 2% beträgt. Die Mischung hat sofort und recht ausgiebig zu geschehen, am besten durch Umstülpen des mit einem Glasstopfen versehenen Gefäßes. (Man wählt für diesen Zweck besser verschiedene kleine Gefäße zu je 100 cm^3 statt eines größeren.) Dann zentrifugiert man; die Dauer läßt sich nicht von vornherein bestimmen. Mit einiger Übung erkennt man bald den richtigen Zeitpunkt zum Unterbrechen.[2])

Trifft man den richtigen Moment, so haben sich die Erythrozyten vollständig abgesetzt; darüber findet sich eine Schicht, die Leukozyten und wenig Plättchen enthält. Das Plasma ist mehr oder weniger weißlich getrübt — von der Hauptmenge eben der Plättchen. Man hebt das Plasma ab, läßt aber eine etwa 2 *cm* hohe Schicht über dem Sediment stehen und zentrifugiert das Plasma 3—4 Stunden mit einer Geschwindigkeit von etwa 2000 Touren. Die Plättchen haften dann als grauweißer Belag am Boden des Gefäßes und lassen sich durch Abspülen mit physiologischer Kochsalzlösung von dem anhängenden Plasma befreien.

Das von *Morawitz* angegebene Verfahren haben auch *Abderhalden* und *Deetjen*[3]) und *Schittenhelm* und *Bodong*[4]) benutzt. Die beiden letzteren benutzten eine Zentrifuge[5]), deren Geschwindigkeit beliebig geändert und jederzeit genau festgestellt werden kann und verfahren folgendermaßen:

Das Blut wird wie üblich in Oxalatlösung aufgefangen. Nach 3- bis 4stündigem Stehen haben sich bei Pferdeblut der größte Teil der Erythrozyten und Leukozyten zu Boden gesetzt. Das blutkörperchenarme, aber plättchenreiche Plasma wird vorsichtig abgehebert und auf die elektrisch betriebene Zentrifuge[5]) gebracht. Man schleudert das Plasma zunächst 15 Minuten bei 1600 Umdrehungen aus. Dabei setzen Erythrozyten und Leukozyten sich vollkommen ab. Die vorsichtig von den Körperchen abge-

[1]) *Morawitz*, Beiträge zur Kenntnis der Blutgerinnung. Deutsches Arch. f. klin. Med. **79**. 215/33 (1904).

[2]) Fluoridplasma scheidet sich rascher ab als Salzplasma.

[3]) *Abderhalden* und *Deetjen*, Weitere Studien über den Abbau einiger Polypeptide usf. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **53**. 285 (1907).

[4]) *A. Schittenhelm* und *Bodong*, Beiträge zur Frage der Blutgerinnung usf. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. **54**. 220 (1906).

[5]) Solche Zentrifugen werden von der Firma *Spindler & Hoyer* in Göttingen nach der Angabe von *C. Jacoby* gebaut und machen bis zu 3500 Umdrehungen in der Minute.

gossene leicht getrübte Flüssigkeit zentrifugiert man jetzt 15 Minuten bei 3200 Umdrehungen. Die Flüssigkeit ist dann vollkommen klar und die Plättchen haften als zäher weißgrauer Belag am Boden des Gefäßes.

Bei Blutarten, deren Formelemente sich nicht so leicht absetzen wie die des Pferdebluts, hält man folgende Bedingungen ein: Man fängt das Blut, z. B. Hundeblut, in Fluornatriumlösung auf, so daß die Fluoridkonzentration schließlich 0·3% beträgt. Man schleudert sofort 40 Minuten bei 1600 Umdrehungen aus zur Abscheidung von Erythrozyten und Leukozyten. Dann schleudert man nochmals 10 Minuten bei 1600 und nach erneutem Abheben 3 Minuten bei 2100 Umdrehungen aus, um schließlich das milchige Plasma noch 30—40 Minuten bei 3200 Umdrehungen zu zentrifugieren zur Abscheidung der Blutplättchen, die dann, wie oben schon angedeutet wurde, mit 0·9%iger NaCl-Lösung abgespült werden können. Es ist nicht zweckmäßig — jedenfalls für manche Zwecke nicht —, die Plättchen in NaCl-Lösung aufzuschwemmen und dann wieder auszuschleudern. Die vorher schon mit recht großen Verlusten arbeitende Methode wird dadurch noch verlustreicher.

d) Stroma.

Im Anschluß an die Methoden zur Isolierung der Formelemente seien hier noch die Methoden zur Isolierung des Stroma aufgeführt.

Als erster hat wohl *Wooldridge*[1]) das Stroma, und zwar nach folgendem Verfahren, zu isolieren versucht.

Frisch geschlagenes Blut wird mit einem mehrfachen Volum 2%iger Kochsalzlösung versetzt und zentrifugiert. Der nach dieser ersten Behandlung bleibende Bodensatz wird noch mehrere Male mit Kochsalzlösung auf der Zentrifuge ausgewaschen, bis das anhaftende Serum entfernt ist. Der aus einem Gemenge verschiedener Formelemente bestehende Brei wird in das 5—6fache Volumen Wasser eingetragen und das Ganze kräftig durchgeschüttelt. Dann fügt man vorsichtig so lange Äther zu, bis die Flüssigkeit vollkommen durchsichtig ist. Jetzt kommt sie von neuem auf die Zentrifuge, um die Leukozyten, die wenig verändert in der Feuchtigkeit schwimmen, abzuscheiden; das Zentrifugieren muß man eventuell so oft wiederholen, bis ein Bodensatz sich nicht mehr bildet.

Der nun erst vollkommen klaren Flüssigkeit setzt man eine 1%ige Lösung von Natriumbisulfat[2]) tropfenweise zu; ist eine genügende Menge von dieser Salzlösung zugegeben, so trübt sich die klare Flüssigkeit bis zu einem ähnlichen Grade wie unverändertes Blut; alsbald ballen sich die ausgefällten Stromata zusammen und setzen sich zu Boden.

Ist das Stroma einmal geschrumpft, so quillt es auch nach langem Waschen mit destilliertem Wasser nicht wieder auf. Da es in verdichtetem

[1]) *L. Wooldridge*, Zur Chemie der Blutkörperchen. Arch. f. Anat. u. Phys. 1881. Phys. Abteil. 389.

[2]) Das saure Salz ist der prinzipiell auch brauchbaren Säure vorzuziehen, weil sich dadurch eine Zersetzung des Hämoglobins vermeiden läßt.

Zustand leicht filtrierbar ist, so kann man alle Beimengungen ausziehen mit Ausnahme einer Spur zersetzten Hämoglobins.

Die gesamten im Obigen beschriebenen Operationen lassen sich bei niedriger Temperatur in wenigen Tagen ausführen.

Ein einfacheres und wie mir scheint besseres Verfahren hat *Pascucci*[1]) angegeben.

Er verfährt folgendermaßen:

Man läßt die Blutscheiben des defibrinierten Blutes sich abscheiden (eventuell zentrifugiert man), hebert das überstehende Serum ab und versetzt den Blutkörperchenbrei[2]) mit dem 15—20fachen Volum einer $^{1}/_{5}$ gesättigten Ammonsulfatlösung. Nach gutem Umrühren läßt man die Blutscheiben sich absetzen, hebert die überstehende Ammonsulfatlösung ab, zentrifugiert das Sediment und gießt die überstehende Flüssigkeit ab. Der Bodensatz wird in ganz dünner Schicht auf flachen Porzellantassen ausgebreitet und bei Zimmertemperatur eintrocknen gelassen. Je rascher dieses Eintrocknen erfolgt, desto bequemer gestaltet sich die weitere Darstellung. Die trockene Masse[3]) wird in kaltem Wasser verteilt, worin der Farbstoff sich löst, während die Stromata am Boden sich ansammeln: sie bleiben in dieser Lösung ungefähr 24 Stunden bei 0°. Dann wird das Wasser über dem Bodensatz durch Dekantieren so oft gewechselt, bis es vollkommen farblos bleibt: anfangs kann man zum Waschen Leitungswasser verwenden, zum Schluß benutzt man destilliertes Wasser. Zuletzt werden die Stromata auf einem Filter gesammelt und mit destilliertem Wasser sorgfältig ausgewaschen.

Die von *Piettre* und *Vila* angegebene Methode[4]) benutzt zum Lackfarbenmachen des Blutes Äther, ein Verfahren, das wegen der Möglichkeit der Aufnahme ätherlöslicher Substanzen aus dem Stroma nicht ganz einwandfrei sein dürfte.

Das Verfahren ist folgendes:

In einen Scheidetrichter von etwa 3 *l* Inhalt bringt man 1000 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung und 500 cm^3 Blutkörperchenbrei von der Dichte 1·11 und mischt das Ganze gut durch. Dann fügt man 250 cm^3 Äther zu und schüttelt vorsichtig um. Der Äther kommt in Berührung mit den Blutkörperchen und bewirkt Hämolyse. Die anfängliche Emulsion klärt sich; es sind 2 Schichten erkennbar: eine untere durchsichtige, die

---

[1]) *O. Pascucci*, Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die Hämolyse. *Hofmeisters* Beitr. **6**. 543 (1905).

[2]) Der Blutkörperchenbrei kann eventuell vorher durch Waschen mit 2%iger NaCl-Lösung von Serumbestandteilen befreit werden (*Wooldridge*), doch ist das nicht unbedingt notwendig.

[3]) Man kommt auch manchmal zum Ziel, wenn man den feuchten Blutkörperchenbrei in viel destilliertes Wasser einträgt. Nach 24 Stunden haben sich die entfärbten Stromaten abgesetzt und können, wie oben, weiterbehandelt werden. Die Darstellung auf diesem Wege gelingt nicht immer und die Ausbeute ist meist eine unvollkommene.

[4]) *Piettre* et *Vila*, Le stroma des globules rouges. Compt. Rend. **143**. 787/90 (1906)

eine konzentrierte Hämoglobinlösung darstellt, und eine obere flockig getrübte, welche die Gesamtheit der freien Stromata und der noch nicht hämolysierten Körperchen enthält. Die untere Schicht läßt man ausfließen, ersetzt sie durch ein kleineres Volum physiologischer Kochsalzlösung und schüttelt von neuem, um die Hämolyse zu vervollständigen. Man läßt die untere Schicht wieder ab und wäscht die Ätherschicht so lange mit salzhaltigem Wasser, bis dieses keine färbende Substanz mehr aufnimmt. Die Stromaflocken sammelt man dann auf einem Filter.

II. Bestimmung des relativen Volums beziehungsweise Gewichts von Formelementen und Plasma oder Serum.

1. Methoden, welche die Beobachtung benutzen, daß gewisse Bestandteile des Blutes entweder nur im Plasma (oder Serum) oder nur in den Formelementen sich befinden oder daß dem Blut zugesetzte fremde Stoffe nicht in die Blutkörperchen eindringen.

Die älteste hierher gehörige Methode ist die von *Hoppe-Seyler* angegebene[1], bei welcher man die Mengen Fibrin, die einerseits in einer gewogenen Menge Blut, andrerseits in einer gewogenen Menge Plasma sich finden, bestimmt.

Man bestimmt in einer Portion Blut (10—40 *cm*³) den Fibringehalt nach der an anderer Stelle beschriebenen Methode.[2] Eine zweite größere Blutportion fängt man in einem in Eis stehenden Standzylinder auf, läßt die Blutkörperchen sich senken, entnimmt mit einer ebenfalls gekühlten Pipette, die der zur ersten Bestimmung angewandten Blutmenge gleiche Plasmamenge und bestimmt in ihr das Fibrin genau ebenso wie im Blut.

Bedeutet a den Prozentgehalt des Blutes an Fibrin,
b „ „ „ Plasmas an Fibrin,

ferner:

x den Prozentgehalt des Blutes an Plasma,
y „ „ „ „ Körperchen,
z „ „ „ „ Serum,

so gelten die Beziehungen:

$$x = \frac{a \cdot 100}{b}; \quad y = 100 - x; \quad z = x - a.$$

Diese Methode wird wegen ihrer nicht allzu hohen Genauigkeit nur wenig angewandt.

Methode von *Bunge*.

C. Schmidt[3]) hat festgestellt, daß in der Zwischenflüssigkeit des Blutes das Natron vorherrscht, in den Körperchen dagegen das Kali.

[1]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch der physiol.- u. pathologisch-chemischen Analyse. 8. Aufl. Berlin 1909. S. 682.

[2]) Dieses Handbuch, Bd. 2. S. 376 (1910).

[3]) *C. Schmidt*, Charakteristik der epidemischen Cholera. Leipzig und Mitau 1850.

G. Sacharjin[1]) hat die Vermutung ausgesprochen, daß in gewissen Blutarten das Natron nur im Serum, nicht in den Körperchen sich finde. Dieser Vermutung ist *G. Bunge*[2]) nachgegangen und hat darauf folgende Methode gegründet:

Man bestimmt in einer gewogenen Menge defibrinierten Blutes nach einem der später zu besprechenden Verfahren das Natron und in gleicher Weise das Natron des Serums.

Bezeichnet dann

a den Prozentgehalt des Blutes an Natron,
b „ „ „ Serums an Natron,
x „ „ „ Blutes an Serum,

so gilt wie bei der Methode von *Hoppe-Seyler* die Beziehung

$$x = \frac{a \cdot 100}{b}.$$

Die Methode liefert Werte, die mit den Zahlen, die nach anderen Methoden gewonnen worden sind, recht gut übereinstimmen. Sie ist aber natürlich nur anwendbar bei Blutarten, für welche die von *Sacharjin* ausgesprochene Vermutung zutrifft, und zwar ist dies nach *Abderhalden*[3]) das Blut vom Pferd, Schwein und Kaninchen.

Für dieses Verfahren ist natürlich prinzipiell jede Substanz brauchbar, die entweder nur im Serum oder nur in den Formelementen sich findet, wie z. B. Fett und Kalk, welche beiden nach *Abderhalden*[4]) in den Formelementen fehlen.

Schließlich steht auch wohl nichts im Wege, diese Methode auch auf nicht geronnenes oder ungerinnbar gemachtes Blut anzuwenden.

Methode von *Stewart*.[5])

Das Prinzip der Methode ist folgendes: Ein Farbstoff, der im Serum löslich ist und weder in die Körperchen eindringt noch in merklicher Weise den osmotischen Druck des Serums beeinflußt, wird in bestimmter Menge einem bestimmten Volum oder Gewicht von defibriniertem Blut zugefügt. Das Blut wird geschüttelt, bis der Farbstoff gleichmäßig verteilt ist und wird dann zentrifugiert. Aus der Menge des Farbstoffs, der in einer gegebenen Menge des gefärbten Serums enthalten ist, kann die Menge des Serums im Blut leicht errechnet werden. Als Farbstoff verwendet man Hämoglobin, das man nach dem Verfahren von *Hoppe-Seyler*[6]) oder

[1]) *G. Sacharjin*, Zur Blutanalyse. *Virchows* Arch. Bd. 21. 337 (1861).

[2]) *G. Bunge*, Zur quantitativen Analyse des Blutes. Zeitschr. f. Biologie. 12. 191 (1876).

[3]) *E. Abderhalden*, Zur quantitativen vergleichenden Analyse des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 25. 65/115 (1898).

[4]) *E. Abderhalden*, Zur quantitativen vergleichenden Analyse des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 25. 109 (1898).

[5]) *B. N. Stewart*, The relative volume of corpuscles and plasma in blood. Journ. of Physiol. 24. 356/93 (1899).

[6]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch etc. 8. Aufl. 1909. S. 458.

sonst einem anderen brauchbaren Verfahren herstellt, wiederholt umkristallisiert und schließlich trocknet.

Das Verfahren ist folgendes:

Ein genau gewogenes oder gemessenes Quantum Blut wird zentrifugiert, bis eine große Quantität klaren Serums sich abscheidet: möglichst viel von diesem vollkommen körperchenfreien Serum wird genau gemessen oder gewogen. 5—15 cm^3 (genau zu bestimmen!) werden in einer Reibschale sorgsam mit einer gewogenen Quantität Hämoglobin zerrieben. Man nimmt gewöhnlich soviel Hämoglobin, daß eine 1—2%ige Lösung von Hämoglobin im Serum entsteht. Von dieser Lösung gibt man eine bestimmte Menge dem Blutkörperchensediment zu, mischt das Sediment gut mit der Lösung und zentrifugiert wieder, bis eine rötliche oder schwärzlich rötliche Serumschicht sich abgetrennt hat, die als „gefärbtes Serum" bezeichnet sei. Auch diese Schicht muß vollkommen frei von Blutkörperchen sein. Man hebt von diesem Serum wieder einen Teil ab und vergleicht ihn mit der Lösung von Hämoglobin in Serum, und zwar in der Weise, daß man die Hämoglobinlösung mit frischem Serum oder mit Wasser verdünnt, bis sie die Farbe des „gefärbten Serums" zeigt, was man mit Hilfe eines Kolorimeters feststellt.

Aus der Menge Serum oder Wasser, die man der ursprünglichen Hämoglobinlösung hinzufügen muß, kann man die Menge Serum, mit welcher jedes Gramm oder jeder Kubikzentimeter der Hämoglobinlösung, die man dem Sediment zugefügt hat, vermischt worden sein muß, und deshalb auch die Menge Serum, die im Sediment nach der Entfernung der ersten Serumportion zurückgeblieben ist, unmittelbar entnehmen. Das spezifische Gewicht des defibrinierten Blutes und Serums wird immer bestimmt, so daß die Menge Serum im Blut sowohl in Kubikzentimeter auf 100 cm^3 als auch in Gramm auf 100 g Blut angegeben werden kann.

Bedeutet

V das angewandte Blutvolum,
v „ Volum der ersten Serumportion,
v' „ „ „ Hämoglobinlösung, die man dem Sediment zugefügt hat,
a „ „ Serum oder Wasser, das jedem Kubikzentimeter von v' zugefügt werden mußte, um seine Färbung der des gefärbten Serums gleich zu machen, dann gilt die Beziehung $\frac{100\,(v + a\,.\,v')}{V}$ = Volum des Serums in 100 cm^3 Blut.

Die Hämoglobinbestimmung ist die einzige Messung, die nicht mit gleich großer Genauigkeit wie die anderen ausgeführt werden kann, aber die Entfernung und Bestimmung der größeren Serumportion vor dem Zufügen der Hämoglobinlösung reduziert den Fehler aus dieser Quelle.

Beispiel:

75 cm^3 Blut zentrifugiert,
43·5 cm^3 klares Serum abgehoben;
0·384 g Hämoglobin werden in 35 cm^3 Serum gelöst und

15 cm^3 der klaren Lösung dem Blutkörperchensediment zugefügt. Man mischt gut und zentrifugiert wieder;
21·5 cm^3 Serum („gefärbtes Serum") werden abgehoben:
2 cm^3 der Hämoglobinlösung geben mit 1·6 cm^3 Serum vom Blut desselben Tieres genau die gleiche Färbung, wie sie das „gefärbte Serum" aufweist.

Also wurden 0·8 cm^3 Serum in dem Sediment gemischt mit je einem Kubikzentimeter der Hämoglobinlösung, die dem Sediment zugefügt worden ist, und es müssen somit nach der Entfernung von 43·5 cm^3 Serum noch $15 \times 0·8 = 12$ cm^3 Serum im Sediment enthalten gewesen sein.

Dies gibt $43·5 + 12 = 55·5$ cm^3 Serum in 75 cm^3 Blut, somit 74·0 cm^3 Serum in 100 cm^3 Blut.

Zum Vergleich sei noch angeführt, daß bei einem anderen Blut ergeben haben die Methode von *Hoppe-Seyler* 58·77 cm^3, die Methode von *Stewart* 59·28 cm^3, die Leitfähigkeitsmethode 59·39 cm^3 Serum in 100 cm^3 Blut: somit gibt die Methode recht befriedigende Resultate.

2. Methoden, welche Bestandteile, die in Formelementen und Zwischenflüssigkeit sich finden, im Blute, Serum (Plasma) und Körperchen gesondert bestimmen und hieraus das Verhältnis von Formelementen zu Serum (Plasma) ermitteln.

Methode von *Hoppe-Seyler*.[1])

Die Methode beruht auf der experimentell begründeten Annahme, daß bei Trennung von Plasma (Serum) und Formelementen durch verdünnte Kochsalzlösung (0·9%ig) keine Proteinstoffe aus den Körperchen austreten. Sie verwendet zur Berechnung folgende experimentell zu ermittelnden Größen:

1. Gehalt des Blutes an Proteinstoffen;
2. Gehalt der Formelemente an Proteinstoffen;
3. Gehalt des Serums an Proteinstoffen. Diese Daten braucht man für defibriniertes Blut; wünscht man die entsprechenden Verhältnisse an Blut, wie es aus dem Körper strömt, kennen zu lernen, so hat man
4. den Gehalt des Blutes an Fibrin noch zu bestimmen.

Die Ausführung gestaltet sich folgendermaßen: Man fängt, wenn es sich um defibriniertes Blut handelt, 3, im anderen Falle 4 einzelne Blutportionen auf.

In der 1. Portion — 5—10 cm^3 —, die man in einem mit Uhrglas versehenen, tarierten Becherglas auffängt und nach dem Erkalten wägt, bestimmt man den Gesamteiweißgehalt nach der Methode, die sich an anderer Stelle[2]) beschrieben findet.

[1]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch der physiologisch- und pathologisch chemischen Analyse. 8. Aufl. 1909. S. 682.

[2]) Dieses Handbuch. Bd. 2. S. 373 (1910).

Als 2. Portion fängt man wieder etwa 5—10 cm^3 Blut in einem Fibrinbestimmungsapparat [1]), den man gewogen und dann auf Körpertemperatur erwärmt hat, auf, bringt das Blut durch Schlagen zur Gerinnung [2]), wägt nach dem Erkalten und mischt die Flüssigkeit in einem größeren Becherglas mit dem zehnfachen Volumen einer Mischung von 1 Teil gesättigter Chlornatriumlöung und 9 Teilen Wasser. Man bringt jetzt die Flüssigkeit quantitativ in die Gläser einer Zentrifuge, schleudert 1—2 Stunden aus, gießt die überstehende Flüssigkeit völlig klar ab, mischt den zurückbleibenden Blutkörperchenbrei mit derselben Salzlösung, zentrifugiert wieder, gießt von neuem ab und verfährt nochmals in der gleichen Weise. Sind auf diese Weise alle Serumbestandteile entfernt, dann werden die in den Zentrifugengläsern sich findenden Rückstände mit möglichst wenig Wasser in ein Becherglas gebracht, durch Alkohol gefällt und zur Bestimmung der Proteinstoffe in der gleichen Weise wie oben das Gesamtblut weiter behandelt.

Eine 3. Portion Blut fängt man in einer auf Körpertemperatur erwärmten Schale auf, bedeckt die Schale und läßt ruhig stehen. Von dem nach eingetretener Gerinnung allmählich aus dem Blutkuchen austretenden Serum wägt man 5—10 cm^3 in einem Becherglas ab und bestimmt in dieser Portion die Serumeiweißkörper. Geht man von defibriniertem Blut aus, so wird man dieses ausschleudern und das abgehobene Serum in gleicher Weise wie oben beschrieben weiter behandeln.

Schließlich benützt man die 4. Portion noch zu der Bestimmung des Fibringehaltes des Blutes nach dem an anderer Stelle [1]) beschriebenen Verfahren.

Die in 1, 2 und 4 erhaltenen Zahlen rechnet man auf 100 *g* Blut um; die in 3 erhaltenen Zahlen auf 100 *g* Serum.

Bezeichnet dann

a den Prozentgehalt des Blutes an Eiweißstoffen;
b „ „ von Fibrin + Eiweißstoffen in den Formelementen;
c „ „ des Serums an Eiweißstoffen;
d „ „ „ Blutes an Fibrin;

ferner

x den Prozentgehalt des Blutes an Serum;
y „ „ „ „ „ Formelementen;
z „ „ „ „ „ Plasma;

so ist

$$x = \frac{a-b}{c} 100; \; y = 100-(x+d); \; z = x+d.$$

Schließlich stammt von *Hoppe-Seyler* noch ein weiteres Verfahren [3]), das im wesentlichen mit dem eben beschriebenen übereinstimmt. Wegen

[1]) Siehe dieses Handbuch Bd. 2, S. 376 (1910).

[2]) Bei defibriniertem Blut vereinfacht sich das Verfahren in leicht ersichtlicher Weise.

[3]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch etc. 8. Aufl. 1909. S. 683.

der bei diesem Verfahren notwendigen kolorimetrischen Bestimmung ist dieses Verfahren vielleicht etwas weniger genau, bietet aber bei Blutarten, deren Formelemente nicht oder nur schwer sich absetzen (auch mit Hilfe der Zentrifuge nicht), den Vorteil, daß ein Verlust an Formelementen ohne Einfluß auf das Resultat der Bestimmung ist.

In einer ersten Blutportion bestimmt man den Gesamteiweißgehalt des Blutes genau so wie auf S. 151 angedeutet.

Die zweite Blutportion wird zunächst genau entsprechend dem, was bei dem vorhergehenden Verfahren für ihre Bearbeitung angegeben wurde, behandelt, wobei es nichts zu bedeuten hat, wenn beim Waschen des Formelementesediments von diesem etwas verloren geht. In einem genau abzumessenden Quantum des von Serumbestandteilen freien Blutkörperchenbreis bestimmt man das Gesamteiweiß, in einem zweiten die Menge des Blutfarbstoffes auf kolorimetrischem Wege.[1])

Die dritte Portion verwendet man zur quantitativen Bestimmung des Fibrins[2]), wobei die abgegossenen und abfiltrierten Waschflüssigkeiten sorgfältig gesammelt und zur Blutfarbstoffbestimmung verwendet werden.

Eine vierte Portion dient schließlich zur Bestimmung der Serumeiweißkörper, wobei man wie bei der vorhergehenden Methode verfährt.

Die in 1, 3 und 4 erhaltenen Werte rechnet man auf 100 *g* Blut bzw. Serum um, die in 2 erhaltenen auf ein bestimmtes Volumen der Flüssigkeit.

Bezeichnet

a den Prozentgehalt des Blutes an Proteinstoffen;
b „ „ „ „ „ Fibrin;
c „ „ „ „ „ Blutfarbstoff;
d „ „ „ Serums an Proteinstoffen;
e das Verhältnis von Proteinstoffen zu Blutfarbstoff in den Körperchen
und ferner
w den Prozentgehalt des Blutes an Proteinstoffen der Körperchen;
x „ „ „ „ „ Serum;
y „ „ „ „ „ Plasma;
z „ „ „ „ „ Körperchen;
so ist

$$w = c \cdot e;\quad x = \frac{[a-(w+b)]\,100}{d};\quad y = x + b;\quad z = 100-(x+b).$$

Methode von *M.* und *L. Bleibtreu.*

Eine Methode, die ebenfalls die im Blut enthaltenen Eiweißkörper zum Ausgangspunkt der Bestimmung des Verhältnisses von Serum

[1]) *Franz Müller*, dieses Handbuch, Bd. 2, S. 705 ff. (1910)

[2]) Dieses Handbuch, Bd. 2, S. 376. Die Fibrinbestimmung fällt in defibriniertem Blute natürlich weg, und es braucht dann nur die Blutfarbstoffbestimmung in Portion 3 ausgeführt zu werden.

(Plasma) und Formelementen macht, haben *M.* und *L. Bleibtreu* ausgearbeitet.[1])

Das Prinzip der Methode ist folgendes: Mischt man Blut mit physiologischer Kochsalzlösung und läßt man die Formelemente sich zu Boden senken, so ist in der Flüssigkeit der Prozentgehalt an Eiweiß bzw. Stickstoff in dem Maße vermindert, als der Flüssigkeit Salzlösung zugefügt worden ist.

Ist die zu der Mischung angewandte Blutmenge $= a$, das zugefügte Volumen Kochsalzlösung $= b$ und bezeichnet x den echten Bruch, mit welchem man das Blutvolum a multiplizieren muß, um das darin enthaltene Flüssigkeitsvolum zu erfahren, so beträgt die Gesamtmenge der in der Mischung enthaltenen Flüssigkeit $ax + b$.

Verwendet man ein bestimmtes Volum dieser Salzlösung-Serummischung zur Analyse, so muß man dieses Volum mit $\frac{ax}{ax+b}$ multiplizieren, um das darin enthaltene Volum Serum zu bekommen. Z. B. sind in 5 *cm*³ des Gemisches $5 \cdot \frac{ax}{ax+b}$ *cm*³ Serum enthalten.

Ergibt dann die Stickstoffbestimmung, daß in diesem Volum e *g* Eiweiß (Stickstoff auf Eiweiß umgerechnet) enthalten sind, so erhält man:

$$\text{in } 5\,\frac{ax}{ax+b}\ cm^3 \text{ Serum } e\,g \text{ Eiweiß;}$$

eine zweite Verdünnung ergibt:

$$\text{in } 5\,\frac{a_1 x}{a_1 x + b_1}\ cm^3 \text{ Serum } e_1\,g \text{ Eiweiß.}$$

Somit sind in 5 *cm*³ Serum enthalten:

$$e_1\,\frac{a_1 x + b_1}{a_1 x} \quad \text{bzw.} \quad e\,\frac{ax+b}{ax}\ g \text{ Eiweiß.}$$

Diese beiden Mengen müssen aber gleich sein; also

$$e_1\,\frac{a_1 x + b_1}{a_1 x} = e\,\frac{ax+b}{ax}.$$

Hieraus ergibt sich dann:

$$x(e - e_1) = e_1\,\frac{b_1}{a_1} - e\,.\,\frac{b}{a}.$$

Aus dieser Gleichung läßt sich x berechnen und damit kennt man auch das Volum der körperlichen Elemente $1 - x$.

Macht man statt 2 Mischungen deren drei, so hat man eine 2fache Kontrolle, indem man x aus der 1. und 2., der 1. und 3. und aus der 2. und 3. Mischung berechnen kann.

Natürlich kann man auch das unvermischte Serum bei dieser Methode mitbenützen; das zugehörige b ist dann eben $= o$; in diesem Falle vereinfacht sich die obige Gleichung für x auf

[1]) *Max Bleibtreu* und *Leopold Bleibtreu*, Eine Methode zur Bestimmung des Volums der körperlichen Elemente im Blut. *Pflügers* Archiv. **51**. 151/228 (1892).

$$(e-e_1)\ x = e_1 \cdot \frac{b_1}{a_1}$$

wobei e den Eiweißwert für das unverdünnte Serum bedeutet.

Die ganze Arbeit bei dieser Methode besteht also darin — im einfachsten Fall — den Eiweißgehalt des Serums und den Eiweißgehalt des Gemisches von Serum + Kochsalzlösung, die man nach dem Zentrifugieren des mit 0·9%iger Kochsalzlösung verdünnten Blutes erhält, zu bestimmen.

Neben den im Vorhergehenden aufgeführten Methoden, die sich chemischer Verfahren zur Ermittlung des Verhältnisses von Formelementen zu Zwischenflüssigkeit bedienen, gibt es noch Methoden, die bestimmte physikalische Eigenschaften von Blut und Serum (Plasma) für den angegebenen Zweck benützen, auf die hier nur verwiesen sei.

Es gehören hierher die von *Schrottenbach*[1]) angegebene Methode, welche das spezifische Gewicht von Blutkörperchen, Plasma und Blut verwertet und ferner die Leitfähigkeitsmethoden, die ziemlich gleichzeitig von *Roth*, *Tangl-Bugarszky* und *Stewart*[2]) angegeben worden sind.

III. Bestimmung des Trockenrückstandes, des Ammoniaks, der Kohlensäure und der Aschenbestandteile.

1. Trockenrückstand.

Die Bestimmung der Trockensubstanz im Blut, Plasma und Serum geschieht am einfachsten in der allgemein geübten Weise, daß man in einem mit gut schließendem Deckel versehenen Wägegläschen mit möglichst breitem Boden ein bestimmtes Quantum abwägt, den Inhalt bis zum Verdunsten der Hauptmenge Wassers auf zirka 90° hält und schließlich bei 115—120° bis zur Gewichtskonstanz trocknet.

Vor kurzer Frist hat *Shackell*[3]) ein Verfahren angegeben, das eine bei höherer Temperatur möglicherweise eintretende Veränderung vollkommen ausschließt.

Ausgehend von der Tatsache, daß im hohen Vakuum Eis verdampfen kann, ohne zuvor in die flüssige Phase überzugehen, läßt *Shackell* besonders stark wasserhaltige Substanzen in einer Eis-Kochsalzmischung gefrieren. Dann bringt er die gefrorene Masse in einen mit Schwefelsäure (konzentriert) beschickten Exsikkator und evakuiert diesen möglichst rasch mit einer Quecksilberpumpe auf einen Druck von wenigen Bruchteilen eines Millimeters.

Besondere Rücksicht muß genommen werden 1. darauf, daß der Exsikkator gut gearbeitet ist, und 2. daß er ein hohes Vakuum dauernd hält

[1]) *H. Schrottenbach*, Eine Methode zur Bestimmung des Volum- und Gewichtsverhältnisses von roten Blutkörperchen und Plasma im Blut durch Wägung. *Pflügers* Archiv. 123. 312/22 (1908).

[2]) Siehe Zentralbl. f. Phys. 11. S. 271, 297, 332 (1897).

[3]) *L. F. Shackell*, An improved method of Desiccation with some applications to biological problems. Am. Journ. of Phys. 24. 324/40 (1909).

(als Dichtungsmittel dient eine Mischung von 5 Teilen Vaselin und 3 Teilen Paraffin); 3. muß die Masse durch und durch gefroren sein; 4. muß die H_2SO_4 von Zeit zu Zeit bewegt werden, damit eine raschere Aufnahme der Wasserdämpfe möglich ist.[1])

In 4mal 24 Stunden sind nach den Angaben von *Shackell* Flüssigkeiten wie Milch oder Blut vollkommen eingetrocknet und der Rückstand gewichtskonstant. Wie wenig Veränderungen sich dabei abspielen, dafür spricht die von *Shackell* angeführte Tatsache, daß nach dem „Eindampfen" von Blut der Rückstand — bis auf die Körperchenelemente, die natürlich zerstört sind — in physiologischer Kochsalzlösung sich leicht löst und das Eiweiß dieser Lösung in gewohnter Weise koaguliert werden kann.

2. Ammoniakbestimmung.

Zur Bestimmung des Ammoniaks in Blut, Plasma und Serum kommen im wesentlichen folgende Methoden in Betracht:

a) Methode von *Folin.*[2])

Das Prinzip der Methode besteht darin, das durch bestimmte Zusätze in Freiheit gesetzte Ammoniak bei niederer Temperatur durch einen starken Luftstrom abzusaugen und in titrierter Säure aufzufangen.

Die hierzu nötige Apparatur findet sich an einer früheren Stelle beschrieben.[3]) Die Ausführung für Blut ist folgende:

50 *cm*³ Blut werden in einem Aräometerzylinder abgemessen und der Zylinder in Eis eingepackt. Man gibt dann zu dem Blut etwa 16 *g* Kochsalz, 25 *cm*³ Methylalkohol und zuletzt 2 *g* getrocknete oder 5 *g* kristallisierte Soda und leitet 5 Stunden lang einen kräftigen Luftstrom (600 bis 700 *l* Luft pro Stunde) durch die Mischung. Nach den ersten 2 Stunden ist es wegen des Schäumens notwendig, nochmals 25 *cm*³ Methylalkohol zuzugeben. Die Vorlage soll nur etwa 10 *cm*³ $\frac{n}{20}$ Schwefelsäure neben Wasser enthalten. Während der letzten 15 Minuten der Luftstrombehandlung oder besser nach Beendigung derselben muß die Vorlage in Wasser von 30—35° eingetaucht werden, damit die in der Flüssigkeit zurückgehaltene Kohlensäure mit dem Luftstrom vor der Titrierung entweicht. Das Blut muß möglichst frisch sein, weil man sonst zu hohe und auch in anderer Weise unzuverlässige Resultate erhält.

Ebenso gute Resultate gibt auch die Methode von *Krüger* und *Reich*[4]) in der Modifikation von *Schittenhelm.*[5])

[1]) Dies erreicht man einfach durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen des Exsikkators.

[2]) *Otto Folin*, Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn und anderen tierischen Flüssigkeiten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **37**. 161/76 (1902/03).

[3]) Dieses Handbuch. Bd. 3. S. 765 (1910).

[4]) *M. Krüger* und *O. Reich*, Zur Methodik der Bestimmung des Ammoniaks im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**. 165 (1903).

[5]) *A. Schittenhelm*, Zur Methodik der Ammoniakbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**. 73/80 (1903).

Sie beruht darauf, das durch Na_2CO_3 frei gemachte Ammoniak im Vakuum abzudestillieren. Sie ist vor allem da am Platz, wo es nicht möglich ist, die für die *Folin*sche Methode notwendige hohe Geschwindigkeit des Luftstroms zu erreichen und führt viel rascher zum Ziel als die *Folin*sche Methode.

Man führt die Bestimmung in folgender Weise aus:

25—50 *cm*³ Blut versetzt man im Destillierkolben[1]) mit 10 *g* Chlornatrium und soviel festem Natriumkarbonat, bis deutlich alkalische Reaktion eintritt. Hierzu genügt meist 1 *g*. Man setzt den Kolben dann ins Wasserbad und verbindet ihn mit der als Vorlage dienenden, im Eiswasser stehenden *Peligot*schen Röhre, die man mit 10—30 *cm*³ $\frac{n}{10}$ HCl und einigen Tropfen Rosolsäure beschickt hat. An dem zweiten Schenkel der Peligotröhre wird die Saugpumpe angeschlossen und der ganze Apparat sofort so gut wie möglich evakuiert. Sobald das Vakuum den höchsten Grad erreicht hat, werden durch den am Kolben angebrachten mit Quetschhahn versehenen Schlauch 20 *cm*³ Alkohol zugegeben und jetzt das Wasserbad auf eine Temperatur von etwa 43° gebracht. In der Folge gibt man von 10 zu 10 Minuten je 15—20 *cm*³ Alkohol auf dieselbe Weise zu, eventuell auch noch 15—20 *cm*³ Wasser, falls die Flüssigkeit zu rasch eindampft. Zum Schluß werden zur Verjagung der Wassertropfen in der Überleitungsröhre nochmals 10 *cm*³ Alkohol zugegeben. Nach 30—40 Minuten ist die Bestimmung zu Ende geführt. Es wird jetzt durch einen Quetschhahn die Pumpe von der *Peligot*schen Röhre abgeschlossen und darauf durch vorsichtiges Öffnen des an dem Kolben angebrachten Quetschhahns die Luft langsam einströmen gelassen.

Die vielfach angewandte ältere Methode von *Nencki* und *Zaleski*[2]) gibt nach den Angaben *Folins*[3]) und von *E. Grafe*[4]) bei Blut leicht zu hohe Zahlen.

3. Bestimmung der Kohlensäure.

Neben der Kohlensäure, die nur physikalisch absorbiert oder in leicht dissoziierender organischer Bindung im Blut, Serum oder Plasma sich findet, ist stets ein Teil als Karbonat bzw. Bikarbonat von Alkalien im Blut enthalten. Für die Bestimmung des ersteren Teils dienen die gasanalytischen Methoden, wie sie im Bd. 3 dieses Handbuchs beschrieben sind. Wir behandeln hier nur die Bestimmung der Gesamtkohlensäure, also die Summe der beiden oben erwähnten Formen.

[1]) Die für die Bestimmung nötige Apparatur ist in Bd. 3 dieses Handbuches auf S. 768 abgebildet und beschrieben.

[2]) *M. Nencki* und *J. Zaleski*, Über die Bestimmung des Ammoniaks in tierischen Flüssigkeiten und Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33. 193/209 (1901).

[3]) *O. Folin*, Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks usf. Zeitschr. f. physiol. Chem. 37. 161/76 (1902/3).

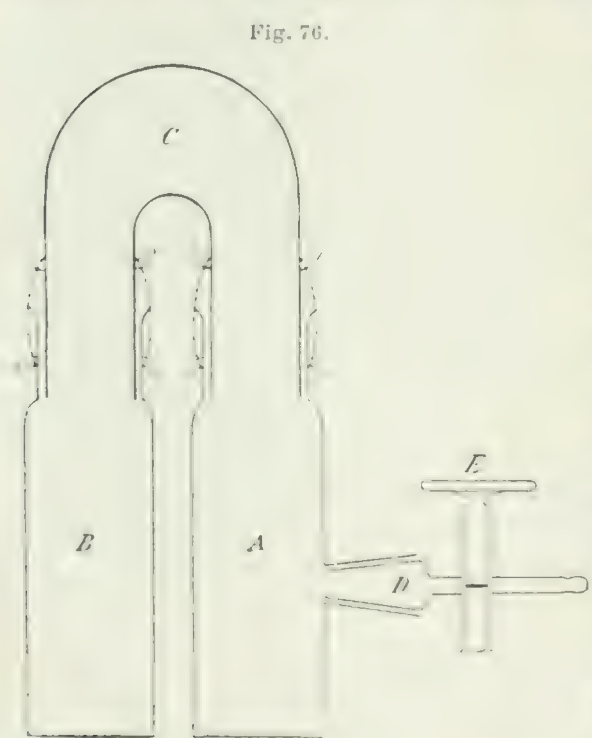
[4]) *E. Grafe*, Methodisches zur Ammoniakbestimmung in tierischen Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chem. 48. 300/14 (1906).

Für diesen Zweck sind verschiedene Apparate und Methoden angegeben [1]) worden, deren einfachste und zugleich auch recht genaue mir folgende [2]) zu sein scheint.

Das Prinzip der Methode ist folgendes:

Durch Oxalsäurezugabe verdrängt man aus dem Blut die Kohlensäure und fängt sie in titrierter Baryumhydroxydlösung auf. Den hierzu nötigen Apparat zeigt nebenstehende Figur. Er besteht aus 2 etwa 100 cm^3 fassenden Glasflaschen *A* und *B* mit weitem Hals, die durch ein gebogenes Glasrohr *C* miteinander verbunden sind: das Glasrohr muß an seinen Enden sehr sorgfältig in die Flaschenhälse eingeschliffen sein. Am Flaschenhals und Glasrohr findet sich jederseits je ein kleiner gläserner Stachel, der zur Aufnahme eines Gummiringes dient, welcher Glasrohr und Flaschen fest zu einem Ganzen verbindet. Die Flasche *A* besitzt ein ebenfalls genau eingeschliffenes Ansatzstück, das durch einen Glashahn luftdicht verschlossen werden kann.

Fig. 76.



Die Bestimmung geschieht in folgender Weise. Die Flasche *A* wird mit doppelt soviel konzentrierter wässeriger Oxalsäurelösung beschickt, als man Blut anzuwenden gedenkt; es genügen 3—5 cm^3 Blut für eine Bestimmung. Man setzt dann das Ansatzstück *D*, dessen Schliff leicht eingefettet ist, ein, setzt die Glasröhre *C* auf und befestigt sie beiderseits mit Gummibändchen. Schließlich füllt man in die Flasche *B* möglichst rasch 80 cm^3 Barytlösung (im Liter 3·5 *g* Baryumhydroxyd und 0·25 *g* Chlorbaryum enthaltend), verbindet sofort mit dem anderen Ende von *C* und saugt durch den Ansatz *D* rasch die Luft ab. Man schließt den Hahn *E* und prüft, ob der Apparat luftdicht schließt in der Weise, daß man durch vorsichtiges Schwenken die Verbindungsteile im Innern benetzt und zusieht, ob das Eintreten kleiner Luftbläschen zu erkennen ist. Ist dies der Fall, so muß der Apparat neu hergerichtet und gefüllt werden. Der Apparat wird, wenn er gut schließt, gewogen und dann in folgender Weise mit Blut beschickt. Man saugt das Blut durch ein Stückchen Kautschukschlauch durch *E* in *A* langsam hinein — wobei man sorgsam darauf achtet, keine Luft mit ein-

[1]) Siehe *Fr. Kraus*, Über die Alkaleszenz des Blutes und ihre Änderung durch den Zerfall der roten Blutkörperchen. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **26**. 186 (1890).

[2]) *W. Dibbelt*, Zur Methodik der Kohlensäurebestimmung im Blut. Arbeiten aus dem pathol. Institut zu Tübingen *(P. v. Baumgarten)*. **6**. 228 (1908).

treten zu lassen. Das Blut kann etweder vorher aus einem Gefäß mit einer gut schließenden Spritze entnommen sein oder aber kann man es mit Hilfe von Hohlnadel und Kautschukschlauch aus dem Blutgefäß direkt in den Apparat überleiten.

Man entfernt dann alles Blut außerhalb des Hahns und schließt dann den Apparat wieder.

Jetzt braucht man den Apparat, den man bei 37° stehen läßt, nur ab und zu umzuschütteln, um die auf der Barytlösung sich bildende Haut von $BaCO_3$ zu entfernen. Bildet sich keine Haut mehr, dies ist nach 2—3mal 24 Stunden[1]) der Fall, dann öffnet man Hahn *E* langsam, entfernt *B* vom Apparat, entnimmt von der vollkommen klaren Flüssigkeit, die über dem Niederschlag von $BaCO_3$ steht, 20 *cm*³ und titriert mit Oxalsäurelösung von bestimmtem Gehalt. Hat man einen Teil der Barytlösung vor dem Versuch titriert, so sind alle Daten zur Berechnung der CO_2-Menge vorhanden.

Verwendet man zur Titration eine Oxalsäure, die im Liter 1·405 *g* Oxalsäure enthält, so entspricht 1 *cm*³ dieser Lösung 0·25 *cm*³ CO_2 bei 0° und 760 *mm* Druck.

Wurde für 20 *cm*³ Barytlösung

vor dem Versuch verbraucht	. . 17·2 *cm*³	Oxalsäure
nach „ „ „	. . 7·2 „	„
	10·0 *cm*³	Oxalsäure

so entspricht diese Differenz bei Anwendung von 80 *cm*³ Barytlösung

$$4 \times 10{\cdot}0 \times 0{\cdot}25\ cm^3\ CO_2 = 10\ cm^3\ CO_2.$$

4. Bestimmung der Aschenbestandteile.

Die Veraschung von Blut, Plasma oder Serum geschieht nach den schon an früherer Stelle eingehend behandelten Grundsätzen.[2]) Ebenso erfolgt die qualitative Untersuchung der Asche und die Bestimmung einzelner Bestandteile nach den an jener Stelle ausführlich angegebenen Regeln.

Nur für die Bestimmung von Fluor und von Jod seien einige neuere Methoden angeführt.

Zur Bestimmung des Fluors im Blut verfährt *Zdarek*[3]) folgendermaßen:

Das Blut wird zur Trockene verdampft und das Gewicht des Trockenrückstandes bestimmt; der Rückstand wird auf dem Wasserbad mit soviel reinstem Natriumhydroxyd (e natrio) erwärmt, daß sicher alle Phosphorsäure als tertiäres Phosphat in Lösung geht und noch ein Über-

[1]) Die Menge der angewandten Oxalsäure verbürgt ein Sterilbleiben auch bei längerem Stehen im Brutschrank.

[2]) *Hans Aron*, Aschenanalyse. Dieses Handbuch. Bd. I. S. 372/428 (1909).

[3]) *E. Zdarek*, Über die Verteilung des Fluors in den Organen des Menschen. Zeitschr. f. phys. Chem. 69. 127/39 (1910).

schuß an NaOH vorhanden ist. Diese Masse wird in der Porzellanschale wieder eingedampft und verkohlt. Die Kohle wird mit Wasser ausgezogen und bei mäßiger Hitze verbrannt. Die Asche wird mit H_2O ausgezogen und diese Lösung mit dem ersten Auszug vereinigt.

Der H_2O unlösliche Teil der Asche wird mit verdünnter Salzsäure längere Zeit behandelt, dann wird filtriert und das Ungelöste auf dem Filter gut ausgewaschen und der Filter verascht, der Glührückstand mit kohlensaurem Natronkali innig gemengt und bei eben ausreichender Hitze aufgeschlossen. Die erkaltete Schmelze wird in Wasser gelöst, die Lösung filtriert und im Filtrat die Fluorbestimmung gewichtsanalytisch durchgeführt.

Im wasserlöslichen Teil der Organasche wird zunächst die überschüssige Soda mit Salzsäure bis zu schwach alkalischer Reaktion abgestumpft, hierauf mit $FeCl_3$ in der Wärme die Phosphorsäure gefällt, die sehr voluminösen Niederschläge gut absitzen gelassen, auf einem Saugfilter gut abgesaugt und gewaschen. Eventuell wurde der Niederschlag nochmals gelöst und wieder gefällt. Beim Eindampfen der großen Flüssigkeitsmengen scheidet sich manchmal noch eine kleine Menge von Eisenphosphat aus, die durch Filtrieren entfernt wird. Dann wird die Analyse in der üblichen Weise weitergeführt und das Fluor als Kalziumfluorid bestimmt.

Den qualitativen Nachweis führt man in der in diesem Handbuch, Bd. 1, S. 401 angegebenen Weise.

Zum Nachweis und zur Bestimmung von Jod verfährt *Bourcet*[1]) folgendermaßen:

Man versetzt das Serum, in welchem allein das Jod in nicht dialysierbarer Form sich findet[2]), mit jodfreier Kalilauge, dampft die Mischung ein (bei stets alkalischer Reaktion) und trocknet den Rückstand bei 100°. Die trockene Masse wird pulverisiert und dann mit reinem Kaliumhydroxyd in einer Nickelschale geschmolzen. Man läßt abkühlen, erschöpft die Schmelze mit heißem Wasser, bis dieses nicht mehr alkalisch reagiert. Die vereinigten Flüssigkeiten dampft man etwa auf die Hälfte ein und fügt der kalten Lösung allmählich verdünnte H_2SO_4 (auf 1 Gewichtsteil reiner konzentrierter H_2SO_4 5 Gewichtsteile Wasser) zu, wobei man, um eine Erwärmung zu verhüten, von Zeit zu Zeit kühlt. Ist die Lösung neutral, dann fügt man einige Tropfen KOH zu, um wieder deutlich alkalisch zu machen und fügt unter Umschütteln langsam 1/2 Volum 95°/0igen Alkohol zu. Der größere Teil des K_2SO_4 fällt als feines Pulver aus. Man saugt an der Pumpe ab und wäscht mit Alkohol (30 auf 100). Das Filtrat engt man auf 1/3 ein und fällt wieder mit Alkohol, saugt den Niederschlag von K_2SO_4 ab, wäscht ihn und engt das Filtrat wieder ein. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Operation kann man beinahe alles K_2SO_4 entfernen, wobei

[1]) *P. Bourcet*, Recherches et dosage colorimetrique de petites quantités de l'iode dans les matières organiques. Compt. Rend. **128**. 1120 (1899).

[2]) *Gley* et *Bourcet*, Présence de l'iode dans le sang. Compt. Rend. **130**. 1721/24 (1900).

das Jod, wenn welches vorhanden ist, sich in den alkalischen in Alkohol löslichen Teilen ansammelt. Die letzte Flüssigkeit wird in einer Nickelschale eingedampft und der Rückstand leicht geglüht, wobei die letzten Anteile organischen Materials zerstört werden. Den abgekühlten Rückstand nimmt man in einem Minimum Wasser auf, filtriert und macht das Jod bei Gegenwart von CS_2 durch nitrose Gase frei. Die Bestimmung erfolgt kolorimetrisch nach den Angaben an anderer Stelle.[1])

IV. Untersuchung des Plasmas und Serums[2]) auf einzelne Bestandteile.

1. Eiweißstoffe.

Von Eiweißkörpern finden sich im Serum (Plasma) Serumalbumin, Serumglobulin, Fibrinogen, Fibrinoglobulin, Serumnukleoproteid und Serummukoid. Ihre Darstellung aus dem Plasma bzw. Serum sowie ihre quantitative Bestimmung ist schon von *Fr. Samuely* im Bd. 2 dieses Handbuches in erschöpfender Weise behandelt worden und es dürfte genügen hier auf die dort[3]) gegebene Darstellung zu verweisen.

2. Fette und fettartige Substanzen.

a) Bestandteile der echten Fette.

Zum Nachweis und zur Bestimmung von „Fett" aus Organen und Körperflüssigkeiten sind im Laufe der Zeit eine Reihe von Methoden ausgearbeitet worden, die alle im wesentlichen darauf ausgehen, mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel die in den Organen usw. enthaltene Summe von Fett und fettartigen Substanzen zu isolieren und dieses Gemenge in geeigneter Weise in seine verschiedenen Bestandteile — Neutralfett, Lezithin, Jecorin, Protagon usw. — zu zerlegen. Die verschiedenen Methoden liefern bei Anwendung auf eine und dieselbe Substanz keine übereinstimmenden Resultate, und zwar hängt dies, wie *Kumagawa* und *Suto*[4]) in einer umfangreichen Arbeit gezeigt haben, jedenfalls zum Teil von der Art des Extraktionsmittels ab, das je nach den Umständen mehr oder weniger von nichtfettartigen Substanzen mitlöst.

[1]) Dieses Handbuch. Bd. 1. S. 428 (1909).

[2]) Eine reinliche Scheidung der Methoden zur Untersuchung von Plasma, von Serum und von Blut habe ich nicht durchführen zu müssen geglaubt. Denn einmal wäre dadurch manche überflüssige Wiederholung nötig geworden, da ja die Aufarbeitung dieser drei Flüssigkeiten im wesentlichen die gleiche ist und dann sind für manche Bestandteile nur Methoden zum Nachweis etc. im Serum, für andere nur Methoden zur Isolierung aus dem Blut ausgearbeitet worden. Es erschien mir deshalb zweckmäßiger, auch Methoden zur Isolierung einzelner Bestandteile aus dem Blut in diesem Abschnitt mit aufzuführen.

[3]) Dieses Handbuch. Bd. 2. S. 357/77 (1910).

[4]) *Kumagawa* und *Suto*, Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanz in tierischem Material nebst Kritik einiger gebräuchlicher Methoden. Biochem. Zeitschr. 8. 213/347 (1908).

„Was von den Bestandteilen des Ätherextraktes für das Fett charakteristisch ist, das sind nur hohe, d. h. nicht flüchtige wasserunlösliche Fettsäuren." [1]) Da sich deren Menge verhältnismäßig leicht feststellen läßt, arbeiteten *Kumagawa* und *Suto* hierfür eine genaue Methode aus. Über die Begründung und Berechtigung dieses Verfahrens ist das Original nachzusehen.[2])

Das für pulverförmiges Material von *Kumagawa* und *Suto* angegebene Verfahren hat *Shimidzu* [3]) zur Anwendung auf Blut (defibriniert), Blutplasma, Blutserum und Blutkörperchenbrei etwas modifiziert. Man verwendet zur Bestimmung der Fettsäuren in den angeführten Flüssigkeiten etc. folgende „kombinierte Alkoholextraktion". [4])

10 *cm*³ Blut (bei Blutkörperchen wohl ein entsprechendes Gewicht) werden mit der 4fachen Menge 95⁰/₀igen kalten Alkohols versetzt und der Niederschlag nach einiger Zeit abgenutscht. Der Rückstand wird im Heißextraktor [5]) mit absolutem Alkohol kochend extrahiert. Die vereinigten Alkoholfiltrate werden verseift (für 10 *cm*³ Blut verwendet *Shimidzu* 2 *g* Na OH), verdunstet, der Rückstand in wenig heißem Wasser aufgelöst und in folgender Weise nach *Kumagawa-Suto* [6]) weiterbehandelt. [7])

Man bringt die Lösung in einen hermetisch schließenden Scheidetrichter von ca. 250 *cm*³ Rauminhalt. Das Becherglas, in dem die Verseifungsflüssigkeit verdunstet wurde, wird 2—3mal mit ein wenig warmem Wasser (etwa 5 *cm*³) ausgespült. Nun wird die Mischung mit 30 *cm*³ 20⁰/₀iger Salzsäure (1·1 D) überneutralisiert. Zu dem Zweck werden am besten nach dem Erkalten des Trichterinhaltes bis auf etwa 40—50⁰ C zunächst 20 *cm*³ der Säure auf einmal hineingegossen, der Trichter dann tüchtig geschüttelt und mittelst Leitungswassers gut abgekühlt. Alsdann werden die übrigen 10 *cm*³ der Säure gegeben und ganz ebenso wie vorher behandelt. Es tritt dabei eine reichliche Ausscheidung auf. Nach guter Kühlung werden nun

[1]) *Kumagawa* und *Suto*, Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanz in tierischem Material nebst Kritik einiger gebräuchlicher Methoden. Biochem. Zeitschr. 8. 250 (1908).

[2]) *Kumagawa* und *Suto*, Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanz in tierischem Material nebst Kritik einiger gebräuchlicher Methoden. Biochem. Zeitschr. 8. 340/46 (1908).

[3]) *Shimidzu*, Ein Beitrag zur *Kumagawa-Suto*schen Fettbestimmungsmethode. Biochem. Zeitschr. 28. 237/73 (1910).

[4]) *Shimidzu*, Ein Beitrag zur *Kumagawa-Suto*schen Fettbestimmungsmethode. Biochem. Zeitschr. 28. 261 (1910).

[5]) Dieser Heißextraktor ist ähnlich dem Bd. 1. S. 183. Fig. 363 beschriebenen *Stock*schen Apparat so eingerichtet, daß die heißen Dämpfe durch das Extraktionsgut treten und das Kondensat ebenfalls seinen Weg durch die zu extrahierende Substanz nehmen muß.

[6]) *Kumagawa* und *Suto*, Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanz in tierischem Material nebst Kritik einiger gebräuchlicher Methoden. Biochem. Zeitschr. 8. 338 (1908).

[7]) Im Rückstande des Blutes verblieben die Restfettsäuren in ganz minimaler Menge. Will man auch diese noch gewinnen, so wird man diesen Rückstand mit einigen Kubikzentimetern Na OH (20 *g* in 100 *cm*³) verseifen und nach *Kumagawa-Suto* mit dem obigen zusammen behandeln.

70—100 cm^3 Äthyläther hinzugegeben und das Gemenge tüchtig geschüttelt. Trennung erfolgt meist sofort. Der Niederschlag verdichtet sich hierbei zu einer dünnen Schicht in der Mitte. Die klare wässerige Schicht wird nach einigen Minuten abgelassen. Der bräunlich gefärbte Äther wird vorsichtig in ein Becherglas umgegossen und der Trichter mit Niederschlag 2mal mit ein wenig Äther (5—10 cm^3) ausgespült. Der Niederschlag wird alsdann mit etwa 5 cm^3 Normalnatronlauge unter Schütteln nochmals aufgelöst und diese alkalische Lösung von neuem mit 30—50 cm^3 Äther tüchtig geschüttelt. Dann wird jene stark saure wässerige Lösung der ersten Schüttelung hineingebracht und nochmals gut geschüttelt. Die Reaktion wird hierbei sauer und die restierende Fettsäure geht hierdurch quantitativ in den Äther über. (Durch wiederholte Prüfung wurde festgestellt, daß sowohl in dem neu ausgeschiedenen, ganz geringen Niederschlage, wie auch in dem Spülwasser keine Spur Fettsäure mehr zurückbleibt.) Die vereinigten Ätherauszüge werden verdunstet, der Rückstand dann nochmals mit absolutem Äther aufgenommen, die Lösung durch Asbest filtriert und verdunstet. Dieses Ätherextrakt, welches außer Fettsäuren, Farbstoff, Milchsäure noch andere Beimengungen enthält, wird jetzt bei 50° einige Stunden gut getrocknet und erst dann mit Petroläther extrahiert. Zu dem Zwecke gießt man am besten auf den noch warmen Ätherrückstand sofort etwa 20—30 cm^3 Petroläther unter sanftem Umschwenken des Becherglases allmählich auf. Es tritt hierbei in der Regel eine milchige Trübung auf. Das Becherglas wird jetzt mit einem Uhrglas bedeckt und 1/2—1 Stunde stehen gelassen, wobei der größte Teil der emulsionsartigen Ausscheidung sich als Harz am Boden niederschlägt. Hierauf wird der Petroläther durch Asbest abfiltriert, das farblose Filtrat verdunstet und der Rückstand bei 50° bis zur Gewichtskonstanz, welche nunmehr in kurzer Zeit erreicht wird, getrocknet. Eine genügende Trocknung des Ätherextraktes vor der Aufnahme desselben in Petroläther ist ganz besonders wichtig, will man die Fettsäuren in reiner farbloser Form erhalten.

Die Ausführung der Methode ist äußerst einfach. Hervorzuheben ist der Umstand, daß man mittelst dieser Methode in einem Tage mehrere Bestimmungen mit Leichtigkeit ausführen kann.

Die nach der Verseifungsmethode dargestellten Fettsäuren werden in einem Scheidetrichter mit etwa 50—70 cm^3 Petroläther aufgelöst, hierzu wird $\frac{n}{5}$ absolut alkoholische Kalilauge in einer solchen Menge zugesetzt, daß dieselbe etwa das 30—40fache Volum des betreffenden Petrolätherextraktes beträgt.

Die Mischung wird einige Male tüchtig geschüttelt. Es entsteht hierbei stets eine absolut klare Auflösung. Hierzu wird genau ebensoviel Wasser gegeben wie die zugesetzte Menge der $\frac{n}{5}$-Kalilauge beträgt und das Ganze ein paar Mal geschüttelt. Indem hierdurch die Konzentration des Alkohols auf ungefähr 50 Volumprozent sinkt, erfolgt jetzt sofort eine

glatte Trennung der oberen Petroläther- und der unteren Alkoholschicht. Dabei gehen die unverseifbaren Substanzen in den Petroläther über, während die Seife in der unteren Alkoholschicht aufgelöst zurückbleibt. Die abgetrennte alkoholische Seifenlösung wird noch einmal mit 30 bis 40 cm^3 reinem Petroläther geschüttelt. Die vereinigten Petrolätherauszüge werden verdunstet und der Rückstand durch eine Nachbehandlung von geringen Mengen beigemengter Fettsäure vollkommen befreit. Zu diesem Zwecke wird das Petrolätherextrakt nochmals in wenig Alkohol aufgelöst, mit 0·5 bis 1·0 cm^3 $\frac{n}{10}$ alkoholischer Natronlauge versetzt, wiederum auf dem Wasserbade verdunstet und 15—30 Minuten bei 100° getrocknet. Der Rückstand wird noch heiß mit Petroläther extrahiert, durch Asbest abfiltriert, verdunstet und nunmehr bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der so isolierte Anteil stellt ein Gemenge von Cholesterin und noch unbekannter unverseifbarer Substanz dar.

(Die Bestimmung des Cholesterins, am besten nach der Digitoninmethode von *Windaus* erfolgend, ist später beschrieben.)

b) Jekorinartige Substanzen und Lezithin.

Nach dem eben beschriebenen Verfahren wird nur die Summe der höheren Fettsäuren — gleichviel in welcher Form auch sie im Blut sich finden — bestimmt.

Für viele Zwecke ist es nun aber von Interesse, einzelne dieser Komponenten zu isolieren; hierzu können folgende Verfahren dienen.

Das von *Drechsel* zuerst aus Pferdeleber isolierte „Jekorin" gewann *Baldi*[1]) nach folgendem Verfahren aus Blut.

Das Blut wird aus der Karotis des Tieres (Pferd) in einem Gefäß aufgefangen und sofort mit absolutem Alkohol gut durchgeschüttelt. (Es ist hierzu mindestens das 3—4fache Volumen des angewandten Blutes nötig.) Der feinflockige Niederschlag (aus etwa 7 *l* Blut) wird bei Zimmertemperatur wiederholt mit Alkohol ausgezogen, so lange bis dieser nichts mehr aufnimmt. Die vereinigten Alkoholauszüge werden bei 70—80° verdampft und der dickflüssige Rückstand mit Äther, der die Hauptmenge des Rückstandes leicht löst, behandelt. Die Ätherlösung läßt man absitzen, filtriert und fällt das Filtrat mit Alkohol. Der Niederschlag wird wieder in Äther gelöst, nochmals mit Alkohol gefällt und dieses Verfahren so lange wiederholt, bis in der Alkoholmutterlauge durch H_2PtCl_6 kein Niederschlag mehr hervorgerufen wird — das Lezithin also entfernt ist.

Der Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt, getrocknet und stellt dann ein gelb bis braun gefärbtes, sehr hygroskopisches Pulver dar, das beim Kochen mit Lauge *Fehling*sche Lösung reduziert unter gleichzeitiger Bildung von Seife.

---

[1]) *Dario Baldi*, Einige Beobachtungen über die Verbreitung des Jekorins im tierischen Organismus. Arch. f. Anat. u. Phys. 1887. Physiol. Abteil. Suppl. S. 100/108.

Nach *Mayer*[1]) stellt man Blutjekorin nach der Methode von *Drechsel* in folgender Weise her. 1½—2 *l* frisches Blut werden mit der gleichen Menge Alkohol längere Zeit geschüttelt (5—8 Stunden). Mit dem Rückstand wird diese Prozedur noch 3mal wiederholt und die vereinigten Alkoholauszüge werden sukzessive im Vakuumapparat bei einer Temperatur zwischen 38 und 40° abdestilliert. Der Abdampfungsrückstand wird erst zur Entfernung von Lezithin und Fett mehrere Male mit absolutem Alkohol behandelt, bis dieser sich nicht mehr färbte und dann in wasserhaltigem Äther aufgenommen (1 Teil Wasser, 3 Teile Äther). Nach 24 Stunden — nicht früher, damit der Äther sich vollkommen klar absetzt — wird filtriert und die völlig klare Ätherlösung vorsichtig mit absolutem Alkohol versetzt. Das Jekorin fällt als weißlich gelber Niederschlag aus, der sich schnell absetzt, so daß die darüber stehende Flüssigkeit sich leicht abgießen läßt. Die Substanz wird dann sofort wieder in Äther gelöst und nach dem Filtrieren mit absolutem Alkohol gefällt.

Nachdem diese Prozedur noch 4—6mal wiederholt worden ist, wird das Jekorin mehrere Male mit absolutem Alkohol gewaschen und dekantiert und schließlich im Becherglas mit den letzten Resten der anhaftenden Flüssigkeit in einen gut vakuumhaltenden Exsikkator gebracht und tagelang über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Wenn man besonders darauf achtet, daß die Ätherlösungen vor dem Zusatz des absoluten Alkohols völlig klar sind, erhält man ein fast weißes Präparat, das in einem möglichst gut schließenden Gefäß sich nur ganz wenig gelb färbt.

Nach diesem Verfahren erhielt *Mayer* aus Rinder- und Pferdeblut N-, P-, S- und Na-haltige Substanzen, die auch nach dem Kochen mit Säuren kein Reduktionsvermögen zeigten. Die Substanz ist nicht hygroskopisch und löst sich in Wasser vollkommen klar mit schwach alkalischer Reaktion.

Das Jekorin aus Hundeblut reduziert dagegen sehr stark, ist außerordentlich hygroskopisch und gibt alle für Leberjekorin charakteristischen Reaktionen. Beim Kochen mit NaOH entweichen übelriechende Dämpfe, die Flüssigkeit erstarrt nach längerem Kochen zu einer seifenartigen Gallerte — beides Reaktionen, welche — nach *Mayer* — das Pferde- und Rinderblutjekorin nicht zeigen.

Um diese (oder ähnliche?) N-, P- und S-haltigen, reduzierenden Substanzen in größerer zu eingehender Untersuchung ausreichender Menge zu erhalten, empfiehlt es sich, sehr große Blutmengen aufzuarbeiten. Dabei ist man aber gezwungen, das Serum nach dem Enteiweißen im Vakuum zur Trockene einzudampfen.[2]) Dies gelingt in später zu beschreibender Weise ohne allzu großen Schwierigkeiten.

[1]) *P. Mayer*, Über Blutjekorin und über das physikalisch-chemische Verhalten des Zuckers im Blut. Bioch. Zeitschr. 4. 545 (1907).

[2]) *E. Letsche*, Beiträge zur Kenntnis der organischen Bestandteile des Serums. Zeitschr. f. phys. Chem. 53. 31 (1907).

Den vollkommen trockenen Rückstand extrahiert man zur Isolierung der Lipoide im Soxhlet mit Äther. Die etwas eingeengte Ätherlösung fällt man mit Azeton vollständig aus, löst den Niederschlag wieder in Äther und fällt nochmals; dieses Lösen und Wiederausfällen wiederholt man im ganzen etwa 5mal. Dann löst man nochmals in Äther und fällt jetzt mit absolutem Alkohol. Niederschlag und Lösung trennt man mit Hilfe der Zentrifuge. Der Niederschlag ist in Äther auch feucht nicht mehr löslich; man löst ihn in wenig Wasser, fügt Alkohol zu, bis die sich einstellende Trübung zu einem Niederschlag sich verdichtet hat und trennt Niederschlag und Lösung wie oben mit Hilfe der Zentrifuge. Löst man den Niederschlag nochmals in H_2O und sucht mit Alkohol zu fällen, so bleibt eine Fällung meist aus, entsteht aber sofort auf Zusatz von Äther zu der alkoholisch wässerigen Lösung. Man filtriert diesen Niederschlag auf einem gehärteten Filter ab, wäscht mit Äther gut aus und trocknet über H_2SO_4. Der graue bis gelbbraune Niederschlag zeigt alle Eigenschaften des *Drechsel*schen Jekorins.

Die vereinigten Mutterlaugen dieses „Jekorins" werden verdunstet, der Rückstand in Alkohol aufgenommen und diese Lösung mit H_2PtCl_6 versetzt. Der reichliche Niederschlag wird in Äther gelöst und durch Alkohol aus dieser Lösung wieder gefällt; er stellt die Platinchloriddoppelverbindung eines Lezithins dar.

Handelt es sich darum festzustellen, ob in dem aus dem Serum oder Blut mit Hilfe von Äther oder einem ähnlichen Extraktionsmittel ausgezogenen Gemenge auch der zweite wesentliche Bestandteil der echten Fette sich findet, so benutzt man für diesen Zweck am besten die von *Tangl* und *Weiser*[1]) ausgearbeitete Methode, die wir später beim Glyzerin noch aufführen werden.

c) Cholesterin, Cholesterinester und Oxycholesterine.

Zur Prüfung auf freies Cholesterin und dessen Isolierung aus dem Serum verfuhr ich folgendermaßen[2]):

Das eiweißfreie Serum wird im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand so lange mit Äther extrahiert, bis nichts mehr aufgenommen wird. Diese Ätherlösung engt man etwas ein und versetzt sie mit Azeton, so lange noch ein Niederschlag entsteht. Man trennt den Niederschlag ab, löst ihn nochmals in Äther und wiederholt die Fällung mit Azeton; dieses Lösen in Äther und Wiederfällen mit Azeton wiederholt man zweckmäßig 3—4mal.

Die Äther-Azetonmutterlaugen werden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird durch Schütteln mit Wasser von eventuell

[1]) *F. Tangl* und *St. Weiser*, Über den Glyzeringehalt des Blutes. *Pflügers* Arch. 115. S. 155 (1906).

[2]) *E. Letsche*, Beiträge zur Kenntnis der organischen Bestandteile des Serums. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 53. S. 65 (1907).

vorhandenen wasserlöslichen Substanzen befreit. Sollten dabei die in Wasser unlöslichen Bestandteile sich nur schwer und langsam abscheiden, so kann man die Abscheidung durch Kochsalzzusatz erleichtern und beschleunigen. Man trennt die wässerige Flüssigkeit im Scheidetrichter ab; sie reagiert in der Regel schwach sauer und kann somit Seifen, die Cholesterin in Lösung halten würden, nicht enthalten. Man wäscht die wasserunlöslichen Bestandteile wiederholt mit Wasser (oder eventuell Kochsalzlösung) und nimmt sie in Äther auf. Diese Lösung trocknet man über Na_2SO_4 und läßt sie teilweise verdunsten: durch vorsichtigen Zusatz von Alkohol zu der stark eingeengten Lösung erreicht man die Abscheidung fester Stoffe, die man auf Ton über konzentrierter H_2SO_4 trocknet. Die vollkommen wasserfreie, gelb gefärbte Masse behandelt man in der Wärme mit wenig Alkohol; dabei bleibt eine ohne weiteres Umkristallisieren reine, bei 76° schmelzende Verbindung zurück, die den nachher zu beschreibenden Palmitinsäurecholesterinester darstellt.

Beim teilweisen Verdunsten der alkoholischen Lösung fällt Cholesterin in den charakteristischen Tafeln aus: nach 2maligem Umkristallisieren aus Alkohol ist es rein und schmilzt bei 144—145°. Aus etwa 30 *l* Serum (Pferdeblut) erhält man auf diese Weise etwa 0·30 *g* reines Cholesterin. Für die quantitative Bestimmung ist das später beschriebene Verfahren von *Windaus* zu empfehlen.

Zur Isolierung der im Serum vorkommenden Cholesterinester verfährt man nach *Hürthle*[1]) am besten in folgender Weise:

Zur Darstellung des Ölsäurecholesterinesters wird das Serum mit dem 3fachen Volum Alkohol von 96% gefällt (Alkohol I), gut durchgeschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Dann wird die Flüssigkeit auf einer Nutsche abgesaugt und das Filtrat in die Kälte gestellt, wobei meist bis zum nächsten Tage einige Nadeln ausfallen, die aus Cholesterinoleat bestehen; ihre Menge ist jedoch sehr gering, so daß man das erste Filtrat füglich weggießen kann.

Der von Flüssigkeit möglichst befreite Serumrückstand wird weiter mit Alkohol zerrieben, und zwar wieder mit der 3fachen Menge des ursprünglich verwendeten Serums (Alkohol II). Der Brei wird in eine Flasche gebracht und mindestens über einen, besser über 2—6 Tage bei 34—40° extrahiert, wobei die Flasche häufig umzuschütteln ist.[2]) Nach dieser Zeit wird der Alkohol wieder abgesaugt und enthält nun fast die ganze Menge des im Serum vorhandenen Ölsäureesters in Lösung. Die Flüssigkeit wird nun in die Kälte gestellt, wo sie bald trüb wird und bis zum nächsten Tage mit nadelförmigen Kristallen erfüllt ist, die den Ester darstellen. War er in reichlicher Menge im Serum enthalten, so fällt ein Teil schon bei Zimmertemperatur aus; um ihn vollständig zu gewinnen, ist es nötig,

[1]) *Hürthle*, Über die Fettsäurecholesterinester des Blutserums. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **21**. 331 (1895/96).

[2]) *E. W. Brown*, A note on the Cholesterinesters of Birds blood. Am. Journ of Physiol. **2**. 306/9 (1899) empfiehlt, einen langsamen Luftstrom durchzuleiten.

den Alkohol mit Wasser zu verdünnen und in der Kälte stehen zu lassen; die letzten Reste lassen sich aber nur durch Verdampfen des Alkohols gewinnen.[1])

Die aus dem Alkohol II gewonnenen Kristalle zeigen häufig wie der Alkohol selbst eine gelbliche Färbung und schmelzen zwischen 37 und 40°. Zur Reindarstellung werden sie ein oder mehrere Male bis zur Konstanz des Schmelzproduktes umkristallisiert, am besten wiederum aus Alkohol; man stellt die Kristalle mit Alkohol in den Wärmeschrank (40°) und schüttelt öfters um; zweckmäßig ist es ferner, nicht gleich die ganze zur Lösung nötige Alkoholmenge zuzusetzen, sondern fraktioniert zu lösen, da der höher schmelzende Palmitinsäureester, falls er dem Präparat beigemengt ist, als der schwerer lösliche erst in den 2. oder 3. Alkoholauszug übergeht. Hat man zum Umkristallisieren nicht soviel Zeit zur Verfügung, so kann man die Kristalle auch in Äther lösen, filtrieren und das Filtrat unter beständigem Umrühren in heißen Alkohol, dem etwas Äther zugesetzt ist, einfließen lassen. In diesem Falle ist aber darauf zu achten, daß der Ester nicht schon direkt ausfällt, denn dann kristallisiert er nicht mehr, sondern bleibt ölig. Die Kristallbildung geht sehr langsam vor sich und der Alkohol darf daher nicht zu rasch erkalten und der Äther nicht zu rasch verdunsten. Niemals kristallisiert der Ester auch in reinem Zustande so schnell wie z. B. das Cholesterin.

Läßt man das 2. Alkoholextrakt des Blutserums (siehe Ölsäureester) stehen, so sieht man in manchen Fällen zuerst kleine Plättchen auftreten, welche auf der Oberfläche ein Häutchen bilden. Werden diese auf dem Filter gesammelt, so zeigen sie beim Trocknen starken Seidenglanz und einen Schmelzpunkt, der in verschiedenen Versuchen zwischen 70 und 80° C liegt. Dieser Körper stellt den Palmitinsäureester des Cholesterins dar; um ihn vollständig aus dem Serum zu gewinnen, muß man dasselbe, nachdem es schon zweimal mit Alkohol behandelt worden ist, mit einer Mischung von Alkohol und Äther mehrere Tage bei etwa 40° C extrahieren, so lange, als diese Mischung aus dem Serum noch etwas aufnimmt. Läßt man die vereinigten Extrakte stehen, so kristallisiert zuerst der Palmitinsäureester aus und nachher häufig noch eine gewisse Menge des Ölsäureesters. Um den Zeitpunkt nicht zu verpassen, in welchem der Palmitinsäureester ausgefallen ist und der Ölsäureester auszufallen beginnt, tut man gut, die gebildeten Krist lle zu wiederholten Malen zu sammeln und ihren Schmelzpunkt zu bestimmen.

Zur Reindarstellung werden die Kristalle in Äther gelöst und filtriert, das Filtrat bis zur leichten Trübung mit absolutem Alkohol versetzt und zur Kristallisation in die Kälte gestellt. Auch heißes Azeton eignet sich zum Umkristallisieren des Palmitinsäureesters.

[1]) In manchen Fällen treten im Alkohol II vor der Bildung der langen Nadeln des Ölsäureesters sehr kleine Nadeln oder Plättchen auf, welche zuerst ein Häutchen an der Oberfläche der Flüssigkeit bilden; sie müssen auf einem Filter gesammelt und getrennt aufbewahrt werden, da sie nicht den Ölsäure-, sondern den Palmitinsäureester des Cholesterins darstellen.

Handelt es sich um die quantitative Isolierung dieser Cholesterinester, so wird das Serum in der oben geschilderten Weise mit Alkohol und Äther vollständig extrahiert. Des weiteren verfährt man genau wie oben und dampft die alkoholisch-wässerigen Lösungen dann ein, wobei man die letzten Reste Cholesteryloleat erhält, allerdings auf Kosten schöner Kristallbildung.

Zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins wird man den Ätherextrakt erst verseifen und zur weiteren Behandlung zweckmäßig das Verfahren von *Ritter*[1]) benützen, das so wie es für Fett verwendet wird, hier wiedergegeben sei.[2])

Etwa 50 *g* Fett werden abgewogen, in eine etwa $1^1/_2$ *l* fassende Porzellanschale gebracht und hier mit 100 *cm*³ Alkohol auf dem Wasserbad gekocht. Zu der Lösung gibt man dann eine Natriumalkoholatlösung, die man so herstellt, daß man 8 *g* Natrium[3]) in 160 *cm*³ 99%igem Alkohol ohne zu kühlen auflöst.

Diese Alkoholatlösung gießt man unter beständigem Umrühren noch warm in die alkoholische Fettlösung. Man erwärmt dann noch einige Zeit auf dem Wasserbad, bis der Alkohol entwichen ist; hierauf fügt man das zirka $1^1/_2$fache Gewicht des verwendeten Fettes an Kochsalz und so viel Wasser zu, daß der Inhalt sich ganz oder doch zum größten Teile auflöst. Dies ist wünschenswert, um eine innige Mischung der Seife mit dem Salz zu erzielen. (Das Salz muß natürlich so gereinigt sein, daß der Äther keine Stoffe aus demselben extrahieren kann.) Es wird nun unter häufigem Umrühren zur Trockene verdampft. Dies kann im Anfang direkt über einer kleinen Gasflamme geschehen; sobald aber ein Brei sich zu bilden beginnt, muß die Verdampfung auf dem Wasserbad fortgesetzt werden. Um die Masse ganz trocken zu erhalten, erwärmt man schließlich noch im Trockenschrank bei zirka 80°. Man beginnt dann mit dem Pulverisieren direkt in der Schale, sobald der Trockenheitszustand es erlaubt. Nachher wird die Masse noch weiter im Trockenschrank belassen und schließlich zu einem feinen Pulver verarbeitet, das dann noch warm in einen Exsikkator über konzentrierte Schwefelsäure gestellt wird. Alsdann schreitet man zur Extraktion in einem geräumigen *Soxhlet*schen Extraktionsapparat. Mit Vorteil verwendet man die käuflichen, schon entfetteten Papierhülsen aus dichtem Filtrierpapier. Das in die Hülse gebrachte Seifenpulver bedeckt man mit einem entfetteten Wattebausch, um das Hinübertreten von Teilen des feinen Pulvers in die Flüssigkeit zu verhindern. Die Extraktion, welche mit gewöhnlichem Äther vorgenommen werden kann, soll ca. 9 Stunden dauern. Unten im Gefäß trübt sich der Äther anfangs gewöhnlich ein

[1]) *Ritter*, Über die Methoden, die zur Abscheidung der Cholesterine aus den Fetten und ihrer quantitativen Bestimmung verwendbar sind. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 34. 430 (1901/2).

[2]) Ätherextrakt aus Serum läßt sich in entsprechender Weise verarbeiten.

[3]) Die vom Petroleum herrührenden, dem Natrium anhaftenden organischen Reste müssen abgeschabt werden.

wenig. Das rührt davon her, daß sich Glyzerin in fein verteiltem Zustande ausscheidet. In kurzer Zeit schlägt sich aber dieses Glyzerin am Boden und an den Wandungen des Gefäßes nieder, so daß die Lösung klar wird. Zur Entfernung noch vorhandener Spuren von Seife und Glyzerin gießt man den ätherischen Extrakt in einen $^3/_4$—1 *l* haltenden Erlenmeyerkolben und wäscht mit frischem Äther einige Male nach. Durch dieses Umgießen hat man das in das Extraktionskölbchen übergegangene Glyzerin zum allergrößten Teile entfernt, indem es an den Wandungen des ersten Gefäßes festhaften bleibt. Der Äther wird dann abdestilliert und der Destillationsrückstand auf dem Wasserbad in ganz wenig Alkohol gelöst. Alsdann gießt man unter Umschwenken nach und nach so viel Wasser zu, bis der Erlenmeyerkolben annähernd gefüllt ist. Man bringt die gefällte Substanz auf ein Papierfilter und wäscht mit reinem Wasser etwas nach. Nun wird der so gereinigte Körper im Filter getrocknet, indem man dasselbe in einem Trichter in einen Trockenschrank bringt und hier bei zirka 60° beläßt. Mit einem kleinen Spatel wird nun sorgfältig so viel als möglich von dem getrockneten Produkt in ein gewogenes Erlenmeyerkölbchen gebracht. Die letzten Reste des Cholesterins auf dem Filter spült man mit Äther in das gewogene Gefäß. Der Äther wird dann wieder abdestilliert oder direkt verdunstet und der Rückstand im Trockenschrank bei 100—120° vollständig getrocknet und dann gewogen.

Da diesem Ätherrückstand wohl immer noch andere Substanzen beigemengt sind[1], empfiehlt es sich für gewisse Zwecke, auf den Rückstand eines der von *Obermüller*[2]) oder *Lewkowitsch*[3]) angegebenen Verfahren anzuwenden oder das Cholesterin mit Hilfe der von *Windaus*[4]) aufgefundenen Komplexverbindung von Cholesterin mit Digitonin zu isolieren und quantitativ zu bestimmen.

Obermüller verfuhr so, daß er den beim Verdunsten des Äthers bleibenden Rückstand in Schwefelkohlenstoff löste, und so lange von einer bromhaltigen Schwefelkohlenstofflösung von bestimmtem Gehalt zusetzte, bis eine ins Gelbrot stechende Farbenerscheinung auftrat.

Lewkowitsch gibt folgende zwei Methoden an:

Cholesterin wird mit der $1^1/_2$fachen Menge Azetanhydrid am Rückflußkühler gekocht, das Reaktionsprodukt auf dem Filter mit warmem Wasser gewaschen, bis die saure Reaktion verschwunden ist und das

[1]) Das ergibt sich unter anderem aus den Angaben von *Obermüller*, Weitere Beiträge zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **16**. 143 (1892), der ein ganz ähnliches Verfahren zur Isolierung des Cholesterins anwendet wie *Ritter* und dabei durchschnittlich 1·1% mehr Cholesterin findet, als er zuvor zugesetzt hatte.

[2]) Siehe bei 1.

[3]) *Lewkowitsch*, Zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins. Berichte d. Deutsch. Chem. Gesellsch. **25**. 65 (1892).

[4]) *Windaus*, Über die Entgiftung der Saponine durch Cholesterin. Berichte d. Deutsch. Chem. Gesellsch. **42**. 245 (1909). Siehe auch *Windaus*, Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **65**. 110 (1910).

Filter samt Niederschlag in einem Kolben mit einer genau gemessenen Menge titrierter alkoholischer Kalilösung gekocht. Das verbrauchte Alkali wird durch Zurücktitrieren des Überschusses bestimmt. Für die Berechnung ist zu berücksichtigen, daß 1 Molekül Cholesterin 1 Azetylgruppe bindet.

Das Cholesterin wird in Chloroform gelöst (für 0·5 *g* etwa 50 *cm*³ $CHCl_3$) und mit 25 *cm*³ einer nach *v. Hübl* bereiteten Lösung von Jod und Sublimat in Alkohol versetzt. Der Überschuß an Jod wird mit Thiosulfat zurücktitriert, da 1 Molekül Cholesterin 2 Atome Jod addiert, ist die Berechnung eine einfache Sache.

Diese Methode ist genauer und führt rascher zum Ziele, als die vorher beschriebene Azetatmethode.

Das genaueste Verfahren ist zweifellos das von *Windaus*[1]) ausgearbeitete, das darauf beruht, daß freies Cholesterin mit Digitonin ein recht beständiges Additionsprodukt liefert. Es gestattet freies Cholesterin und Ester nacheinander in einer Portion zu bestimmen.

Man verfährt folgendermaßen: Das zu untersuchende Material löst man in der 50fachen Menge kochenden 95⁰/₀igen Alkohols und versetzt mit einer 1⁰/₀igen Lösung von Digitonin in Alkohol (90⁰/₀), so lange noch ein Niederschlag entsteht. Nach mehreren Stunden wird auf dem Goochtiegel abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen, bei 100⁰ getrocknet und gewogen.

Aus der Menge A des Additionsproduktes läßt sich die Menge C des Cholesterins berechnen:

$$A : C = 1539·06 : 386·35 \text{ [2]) oder } C = A \times 0·2431.$$

Das Filtrat des Digitonincholesterids wird konzentriert, nach Zusatz von Wasser mit Petroläther oder Äther ausgeschüttelt; das überschüssige Digitonin bleibt in der wässerig-alkoholischen Flüssigkeit, während Cholesterinäther, Fette und andere Lipoide in den Petroläther übergehen. Man destilliert den Petroläther ab, verseift den Rückstand mit Natriumäthylat in der Hitze, isoliert das gebildete Cholesterin durch Ausschütteln mit Petroläther und bestimmt das Cholesterin nach der Digitoninmethode.[3])

Neben Cholesterin finden sich, wie *Lifschütz*[4]) gezeigt hat, auch noch sogenannte Oxycholesterine im Blut. Ihr Nachweis wird in folgender Weise geführt:

[1]) *A. Windaus*, Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 65. 110/117 (1910).

[2]) M.-G. des Additionsproduktes beziehungsweise von Cholesterin.

[3]) Da das Digitonin recht wertvoll ist, empfiehlt es sich, es jeweils wiederzugewinnen. Dies ist leicht möglich dadurch, daß man das Additionsprodukt etwa 10 Stunden mit Xylol extrahiert (im Apparat von *Stock*, siehe Berichte d. Deutsch. Chem. Gesellsch. 39. 1976 (1906), eine Abbildung findet sich dieses Handbuch. Bd. 1. S. 183. Fig. 363), wobei das Digitonin quantitativ in das Xylol übergeht.

[4]) *Lifschütz*, Die Oxydationsprodukte des Cholesterins in den tierischen Organen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 53. 140 (1907).

Frisches, noch lebenswarmes Rinderblut wird auf dem Wasserbad gut eingetrocknet. Die bräunlich schwarze, fast steinfeste Masse wird möglichst fein zermahlen und mit Benzin 6—8 Stunden lang extrahiert. Nach der Beseitigung des Benzins bleibt eine dunkelbraune, weiche, sehr dickflüssige und ziemlich klebrige Fettmasse zurück, die selbst über 100° C zwar völlig klar durchsichtig ist, aber doch schwer beweglich und dickflüssig bleibt. Sie betrug 1·5—1·8% vom Trockenblut. Die rohe Fettmasse wird nun mit alkoholischem Kali verseift. Nach dem Erkalten des Verseifungsgemisches scheidet sich eine erhebliche Menge kristallinischer Substanz aus. Das Gemisch wird, ohne vorheriges Filtrieren, mit etwa dem gleichen Volum Wasser vermengt, dreimal mit Äther tüchtig ausgeschüttelt und die vereinigten ätherischen Lösungen mit Wasser wiederholt gewaschen, bis sie gegen Phenolphtalein neutral reagieren. Nach dem Verdunsten des Äthers und Verjagen des Wassers mit absolutem Alkohol auf dem Wasserbade scheidet sich zunächst eine erhebliche Menge weißer, glänzender Plättchen aus, die unter dem Mikroskop die bekannten Cholesterintafeln erkennen lassen und die nach dem völligen Eintrocknen der Substanz in einer wesentlich überwiegenden Menge hellgelber, fetter, amorpher Masse eingebettet sind.

Den Nachweis, daß es sich bei dem Rückstand um ein Gemenge von Cholesterin und Oxycholesterinen handelt, führt man nach *Lifschütz* mit Hilfe der *Liebermann*schen Cholestolreaktion und mit Hilfe der von *Lifschütz* angegebenen Essigschwefelsäurereaktion, die reines Cholesterin nicht gibt.

Man stellt sie in folgender Weise an[1]): Man löst wenige Milligramme des Rückstandes in Eisessig (etwa 2—3 cm^3) und setzt zur kalten Lösung 4 bis 5 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 zu. Dabei färbt sich die Lösung ohne Selbsterwärmung schwach rotgelb, wird beim Stehen intensiv grün und zeigt alsdann ein sehr charakteristisches Absorptionsspektrum in Gestalt eines schmalen tiefdunklen Streifens im Rot zwischen C und d und eines ebenso schmalen, aber viel schwächeren Streifens auf D. Die Farbe hält sich 10 bis 15 Stunden und geht dann durch Grüngelb in Braungelb über. Das Spektrum aber ist selbst nach 24 Stunden noch scharf sichtbar.

3. Kohlehydrate.

Zum Nachweis und zur Bestimmung des im Blut (Gesamtblut, Plasma oder Serum) sich findenden Zuckers sind eine Reihe von Methoden ausgearbeitet worden, deren Unterschiede zur Hauptsache in der Art der Vorbereitung der Lösung für die eigentliche Zuckerbestimmung liegen. Im folgenden ist auf diesen Punkt besonders Rücksicht genommen; der Nachweis und die Bestimmung des Zuckers erfolgt in jedem Falle nach Regeln, die schon an früherer Stelle[2]) beschrieben sind.

---

[1]) *Lifschütz*, Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung des Wollfetts. Berichte d. Deutsch. Chem. Gesellsch. 31. 1133 (1898).

[2]) Dieses Handbuch. Bd. 2. S. 85/183; speziell der Beitrag von *B. Tollens* und der von *K. Grube*.

Hat man die Aufgabe, den Zuckergehalt des Blutes so wie es im Körper strömt, festzustellen, so ist es von wesentlicher Bedeutung, das Blut so aufzufangen, daß Glykolyse nicht eintreten kann. Dies erreicht man dadurch, daß man das Blut direkt aus der Arterie oder Vene in Alkohol oder in einer heißen Salzlösung auffängt; diese beiden Wege sind nur zur Bestimmung des Zuckers in dem Blut als Ganzem brauchbar; oder aber man fängt das Blut in Fluornatrium auf, das ebenfalls imstande ist, die Glykolyse zu hemmen.

Glukose.

Bei der Vorbereitung zur Bestimmung der Glukose im Plasma oder Serum verfahren *Rona* und *Michaelis*[1]) folgendermaßen:

50 cm^3 Plasma oder Serum werden mit der 15fachen Menge Wasser versetzt, mit Essigsäure schwach angesäuert (etwa so weit, bis die anfänglich entstehende Trübung sich wieder aufzuhellen beginnt.) Zu der Flüssigkeit, deren Volum genau festgestellt wird, fügt man dann auf je 100 cm^3 Flüssigkeit 20—25 *g* Kaolin in kleinen Portionen unter stetem Umschütteln hinzu; ist aller Kaolin zugefügt, so kann der Niederschlag sofort abgesaugt werden. (Spuren von Kaolin, die anfänglich vielleicht mit durchgehen, werden am besten erst nach Einengen des Filtrats durch Filtrieren entfernt.) Das Filtrat wird genau gemessen — es beträgt gewöhnlich $^4/_5$ der Gesamtflüssigkeit[2]) — und auf dem Wasserbad bis zur geeigneten Konzentration eingeengt. In dieser Flüssigkeit kann die Zuckerbestimmung titrimetrisch, gravimetrisch oder polarimetrisch bestimmt werden.

Für Blut ist dieses Verfahren der Enteiweißung nicht brauchbar, da die Fällung des Hämoglobins nicht quantitativ erfolgt. Für Blut empfiehlt sich aber folgendes Verfahren, das *Oppler* und *Rona*[3]) angegeben haben und das auch *Moeckel* und *Frank*[4]) mit gutem Erfolg für Plasma und für Blut angewandt haben.

Das durch Fl Na ungerinnbar gemachte Blut wird in einem geräumigen Kolben auf das 10fache mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Eisenlösung (Liquor ferri oxydati dialysati und nicht Liquor ferri oxychlorati) wird mit H_2O etwas verdünnt und in dünnem Strahl unter beständiger lebhafter Bewegung des Gefäßes der Blutlösung hinzugefügt. Von der Eisenlösung (unverdünnt) sind für 1 *g* Hundeblut in der Regel 3 cm^3, für 1 *g* Kaninchenblut 2·5 *cm* genügend. Ein Überschuß innerhalb gewisser

[1]) *Rona* und *Michaelis*, Untersuchungen über den Blutzucker. Biochem Zeitschr. 7. 330 (1908).

[2]) Da die Konzentration des Filtrats dieselbe ist, wie die der im Kaolin zurückbleibenden Flüssigkeit, kann die gefundene Zuckermenge auf die Gesamtflüssigkeit umgerechnet werden.

[3]) *Oppler* und *Rona*, Untersuchungen über Blutzucker. III. Biochem. Zeitschr. 13. 122 (1908).

[4]) *Moeckel* und *Frank*, Ein einfaches Verfahren der Blutzuckerbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 65. 323/29 (1910); 69. 85/88 (1910).

Grenzen ist unschädlich; die Bluteisenmischung bleibt unter häufigem Umschütteln etwa 10 Minuten stehen, dann fügt man 1 *g* fein gepulvertes $MgSO_4$ auf einmal hinzu und schüttelt kräftig 1—2 Minuten lang; damit ist die Enteiweißung vollendet. Ist sie gut gelungen, so erfolgt die totale Ausflockung schnell und die darüber stehende klare farblose Flüssigkeit ist zur Filtration fertig. Zeigt eine mehr oder weniger ausgesprochene Färbung eine unvollständige Fällung des Hämoglobins an, so fügt man nochmals Eisenlösung zu, je nach den Umständen einige Tropfen bis mehrere Kubikzentimeter; ein weiterer Elektrolytzusatz ist unnötig. Das Volum der Flüssigkeit samt Niederschlag wird genau bestimmt; die klare farblose Lösung wird vom Niederschlag durch ein Faltenfilter abfiltriert, der Rückstand auf dem Filter ausgepreßt und eventuell noch ausgeschleudert. Das wasserklare, eiweißfreie Filtrat, dessen Volumen ebenfalls genau festgestellt wird, wird mit wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure angesäuert und dann bei vermindertem Druck (15 *mm* Hg) und 45° Wasserbadtemperatur auf wenige Kubikzentimeter (3—5) eingeengt und quantitativ in einen graduierten Standzylinder von 10 *cm*³ Inhalt übergeführt. Man bestimmt das Volum genau, filtriert und führt jetzt die Zuckerbestimmung polarimetrisch oder titrimetrisch aus.

Für die polarimetrische Bestimmung ist die Berechnung folgende:

Sei c der aliquote eingeengte Teil, z der am Polarimeter abgelesene Zuckergehalt in c (prozentisch), l das Volum der Gesamtflüssigkeit (Blut-Eisenlösung und Z der nicht eingeengte aliquote Teil), dann ist $x = \frac{c.z.l}{Z.100}$ *mg* Zucker in der zur Untersuchung verwendeten Menge Blut.

Die bei den eben beschriebenen Methoden der Enteiweißung des Blutes notwendige Verdünnung mit Wasser hat ein ziemlich zeitraubendes Eindampfen der Filtrate im Vakuum zur Folge. Dies umgeht man bei Anwendung der folgenden Methode von *Bang*.[1]) Ein Zentrifugenröhrchen von zirka 200 *cm*³ Inhalt wird mit 100 *cm*³ Alkohol beschickt und gewogen. Nach dem Zusatz von etwa 30—50 *cm*³ Blut (direkt aus der Ader) wird wieder gewogen. Man zerteilt die Blutkoagula fein mit dem Glasstabe, spült diesen mit zirka 50 *cm*³ Alkohol ab und zentrifugiert eine Stunde. Die Flüssigkeit wird von dem Rückstand, der fest an dem Röhrchen haftet, abgegossen und der Rückstand wieder mit 100 *cm*³ Alkohol zerrührt und zentrifugiert (³/₄ Stunden). Die Flüssigkeit wird abgegossen und der Rückstand zum dritten Male mit 50 *cm*³ Alkohol verrührt und zentrifugiert (¹/₂ Stunde). Die vereinigten Flüssigkeiten werden auf dem Wasserbad bis zu 10 *cm*³ konzentriert, in einen Meßzylinder übergeführt, auf 30—40 *cm*³ (je nach der Blutmenge und dem Zuckergehalt) ergänzt. Man setzt 2—3 *g* Kaolin am besten portionsweise hinzu, schüttelt durch und filtriert. Im Filtrat läßt sich der Zucker bequem nach der *Bang*schen Methode bestimmen.

[1]) *I. Bang*, Über die Bestimmung des Blutzuckers. Biochem. Zeitschr. 7. 327/28 (1908).

Die von *Waymouth Reid*[1]) angegebene Methode der Enteiweißung benutzt für diesen Zweck die Fällbarkeit der Eiweißkörper durch Phosphorwolframsäure. Auch *Vosburgh* und *Richards*[2]) haben sich dieses Verfahrens mit gutem Erfolg bedient und *Mac Leod*[3]) gibt ihm den Vorzug vor dem Verfahren von *Schenk*[4]), das vielfach Anwendung findet; letzteres soll etwas zu niedrige Zahlen geben, offenbar weil durch Sublimat ein Teil der reduzierenden Substanzen gefällt wird.

Das Verfahren von *Waymouth Reid* ist folgendes:

Man läßt das Blut direkt vom Blutgefäß in ein möglichst hohes Becherglas[5]), das mit 250 cm^3 Phosphorwolframsäure[6]) beschickt und mit einem Glasstab mit Kautschukkappe versehen ist, einfließen. Die Menge des Blutes betrage etwa 50 cm^3; vor und nach dem Zufließenlassen des Blutes wird genau gewogen. Man erhitzt dann auf dem Ölbad zum Kochen und hält die Masse im Kochen, bis der Eiweißniederschlag als bröcklige Masse sich absetzt. Nach dem Abkühlen filtriert man die klare überstehende Flüssigkeit ab, neutralisiert annähernd (läßt aber die Reaktion schwach sauer) und zerreibt den Niederschlag in einer Reibschale zu einer — nach Aussehen und Korngröße — schokoladeähnlichen Masse. Man fügt etwas kaltes Wasser zu und saugt den Niederschlag trocken. Dieses Zerreiben und Auswaschen des Niederschlages wiederholt man etwa 3mal. Die Waschwässer werden jedesmal annähernd neutralisiert, schließlich in einem schiefliegenden Jenaer Kolben bis auf etwa 50 cm^3 eingeengt und diese Flüssigkeit mit dem Hauptfiltrat vereinigt. Man dampft das Ganze in der Schale auf etwa 40 cm^3 ein, neutralisiert genau (Lackmus), filtriert durch ein aschefreies Filter in einen 100 cm^3-Meßzylinder und wäscht das Filtrat mit Wasser nach, bis das Gesamtfiltrat etwa 85 cm^3 beträgt. In dieser Flüssigkeit bestimmt dann *Reid* den Zucker nach der *Allihn*schen Methode durch Wägung des ausgeschiedenen Kuprooxyds.

Alkohol zum Enteiweißen von Serum oder Blut verwendeten *Dastre*, *Pavy* und *Siau* u. a.

Das Verfahren von *Dastre*[7]) ist folgendes:

Man läßt das Blut direkt aus Vene oder Arterie in etwa die 3fache Menge Alkohol einfließen. Man trennt den Niederschlag ab, preßt ihn aus, trocknet

---

[1]) *Waymouth Reid*, A method for the estimation of sugar in blood. Journ. of Physiol. **20**. 316/21 (1896).

[2]) *Ch. H. Vosburgh* and *A. N. Richards*, On experimental study of the sugar content and extravascular coagulation of the blood after administration of adrenalin. Amer. Journ. of Physiol. **9**. 34/51 (1903).

[3]) *J. F. R. Mac Leod*, A comparison of the methods of *Reid* and *Schenk* for quantitative estimation of the reducing substance in blood. Journ. of biolog. Chem. **5**. 443/52 (1908/09).

[4]) *Fr. Schenk*, Über Bestimmung und Umsetzung des Blutzuckers. *Pflügers* Archiv. **55**. 203/11 (1894). Findet sich in diesem Handbuch Bd. 2. S. 184 beschrieben.

[5]) Die Masse schäumt beim Kochen unter Umständen ziemlich stark.

[6]) 70 *g* Phosphorwolframsäure und 20 cm^3 Salzsäure von der Dichte 1, 12 verdünnt man auf 1000 cm^3.

[7]) *A. Dastre*, L'analyse de sucre dans le sang. Arch. de Phys. V. (Sér. III). 1891. 533/46.

ihn bei etwa 80° und zieht ihn wiederholt mit Alkohol aus, nachdem man ihn vorher fein zerrieben hat. Man verdampft die Lösung (am besten im Vakuum), sollte sie noch etwas gefärbt sein, so entfärbt man sie mit Tierkohle, die zwar aus wässeriger, nicht aber aus alkoholischer Lösung Zucker adsorbiert. Den beim Eindampfen bleibenden Rückstand nimmt man mit Wasser auf, bringt diese Lösung bei Anwendung von 25—50 *cm*³ Blut auf 80—100 *cm*³ und führt in dieser Lösung die Zuckerbestimmung aus.

Das an derselben Stelle von *Dastre* noch angegebene 2. Verfahren scheint mir keine Vorteile zu bieten. Es besteht darin, daß man mit Oxalat ungerinnbar gemachtes Blut tropfenweise in eine kochende, etwa 10%ige Na_2SO_4-Lösung (4—6faches Volum des anzuwendenden Blutes), die man vorher mit Essigsäure angesäuert hat, einfließen läßt und dann Niederschlag und Lösung in gleicher Weise wie oben weiter behandelt.

Das im folgenden zu beschreibende Verfahren von *Pavy* und *Siau*[1]) entspricht im wesentlichen dem von *Bang* (siehe oben) angegebenen.

Man läßt das Blut — etwa 30 *cm*³ — in die 10fache Menge Alkohol einfließen und läßt 24 Stunden stehen; nach dieser Zeit rührt man den Niederschlag auf und kocht den Inhalt des Becherglases im Wasserbad auf. Man kolliert, nimmt den Eiweißniederschlag vom Tuch ab und zerreibt ihn in der Reibschale zu einem feinen Pulver; das Pulver wird mit 100 bis 150 *cm*³ Alkohol nochmals aufgekocht, der Niederschlag abfiltriert und die ganze Manipulation nochmals wiederholt. Die vereinigten Filtrate engt man auf dem Wasserbad bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur unter vermindertem Druck ein bis zur Trockene. Zum Rückstand gibt man 10 *cm*³ Aluminiumhydroxydpaste[2]) und 20 *cm*³ Wasser, kocht das Ganze auf dem Sandbad lebhaft auf, filtriert, bringt Filtrat und Waschwasser auf 100 *cm*³ und bestimmt den Zucker nach *Pavys* oder einer anderen Methode.

Virtueller Zucker.

Alle die bis jetzt beschriebenen Methoden verfolgen den Zweck, die Glukose, soweit sie im Blut frei oder nur in ganz loser Bindung sich findet, in möglichst reiner, vor allem eiweißfreier Lösung zu erhalten und dann zu bestimmen.

Nach den Untersuchungen von *Lépine* vor allem findet sich im Blut noch sogenannter „virtueller" Zucker, der einer direkten Bestimmung nicht zugänglich ist. Man muß ihn vielmehr zuvor durch Hydrolyse in Freiheit setzen. Das Verfahren, das *Lépine* und *Boulud*[3]) zum Nachweis und zur

[1]) *F. W. Pavy* and *R. L. Siau*, An experimental enquiry upon Glykolysis in drawn blood. Journ. of Physiol. **27**. 451/56 (1901/02).

[2]) Die Aluminiumhydroxydpaste stellt man aus Kalium- oder Ammoniumalaun durch Zugabe von Ammoniak her; man wäscht den Niederschlag alkalifrei und bewahrt den Niederschlag feucht bis zur Verwendung auf. Durch diese Paste werden die letzten Eiweißreste und auch Farbstoffe sicher entfernt.

[3]) *Lépine* et *Boulud*, Sur le sucre total du sang. Compt. Rend. **147**. 226/28 (1908); ferner: Sur le sucre total du plasma et des globules du sang. Compt. Rend. **149**. 583/86 (1909).

Bestimmung dieses virtuellen Zuckers verwenden, ist im wesentlichen folgendes. In einem Teile des enteiweißten Blutes bestimmt man den in freiem Zustande vorgebildeten Zucker nach einem der erprobten Verfahren, in einer zweiten Probe spaltet man den gebundenen Zucker ab, indem man das wie vorher erhaltene Extrakt unter Druck im Wasserbad erhitzt. Die Lösung enthält dabei Fluorwasserstoffsäure, und zwar geben *Lépine* und *Boulud* auf 500 *cm*³ Flüssigkeit 5 *cm*³ einer 50%igen Fluorwasserstoffsäure. Das Erhitzen dauert in der Regel 28—32 Stunden; dabei empfiehlt es sich aber, einige in gleicher Weise angesetzte Proben verschieden lang zu erhitzen. Die Probe, in der der Zuckerwert die höchste Höhe erreicht, ist die richtige.

Erhitzt man zu kurz, so ist es möglich, daß noch nicht aller Zucker frei gemacht wurde, und erhitzt man zu lange, so besteht die Gefahr, daß ein Teil des Zuckers wieder zerstört wird.

Nach älteren Angaben von *Lépine* und *Boulud* handelt es sich bei diesem virtuellen Zucker zum mindesten teilweise um Glukuronsäure, denn sie sagen[1]: „Es kommt vor, daß der aus Blut hergestellte Auszug, ohne daß er mit Säure in Berührung kam, bei der polarimetrischen Prüfung keinen Zucker anzeigt und höchstens eine ganz schwache Reduktionskraft aufweist. Nach dem Kochen mit Säuren findet man eine deutliche Rechtsdrehung und eine hohe Reduktionskraft. Unterwirft man den Auszug der Vergärung mit Bierhefe, so beobachtet man nach der Vergärung eine Linksdrehung, die nach dem Kochen in eine Rechtsdrehung übergeht, wobei gleichzeitig eine wesentlich stärkere Reduktionskraft zu beobachten ist. Ferner gelingt es aus dem Auszug mit Hilfe von p-Bromphenylhydrazin die für Glukuronsäure charakteristische Verbindung zu erhalten."

Glukuronsäure.

Daß Glukuronsäure, die wohl auch *Pavy* und *Siau* als Phenylhydrazinverbindung in Händen gehabt haben[2], im Blut sich findet, ist durch *P. Mayer* sichergestellt.

Er führt den Nachweis der Glukuronsäure in folgender Weise[3]:

2 *l* Ochsenblut läßt man möglichst frisch sofort nach dem Schlachten in die nach *Abeles*[4]) vorbereitete Zinkazetatlösung einfließen (die Zinkazetatlösung stellt man her aus einem dem anzuwendenden Blut gleichen Volum absoluten Alkohols und 5% vom Gewichte des Blutes an Zinkazetat. Die

[1]) *Lépine* et *Boulud*, Sur l'acide glycuronique dans le sang du chien. Compt. Rend. 135. 139/40 (1902).

[2]) *F. W. Pavy* and *R. L. Siau*, On the nature of the sugar present in normal blood, urine and muscle. Journ. of Phys. 26. 282/90 (1900/01).

[3]) *P. Mayer*, Über eine bisher unbekannte reduzierende Substanz des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chem. 32. 518/30 (1901).

[4]) *Abeles*, Über ein Verfahren zum Enteiweißen des Blutes für die Zuckerbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15. 495/504 (1891).

trübe Lösung wird mit dem darin suspendierten ziemlich reichlichen Niederschlag direkt verwendet). Wenn die Mischung eine gleichmäßige schwarzgraue Masse bildet, in der sich keine roten Blutklümpchen mehr finden, verarbeitet man sie in folgender Weise weiter: Man filtriert durch ein mit Alkohol angefeuchtetes Filter, wäscht mit 90—95%igem Alkohol nach, bringt den Rückstand auf ein mit Alkohol angefeuchtetes Stück Leinwand und preßt mit der Handpresse scharf aus. Der Preßrückstand wird mit Alkohol zu einem feinen Schlamm zerrieben, filtriert und der Rückstand wieder ausgepreßt. Die gewöhnlich etwas trüben Filtrate werden zur Entfernung des überschüssigen Zinks mit einer konzentrierten Lösung von Na_2CO_3 (1:5) unter Umrühren bis zu schwach alkalischer Reaktion versetzt. Das ausfallende $ZnCO_3$ sowie das überschüssige ausfallende Na_2CO_3 klären die Lösung, die vollkommen klar und beinahe farblos filtriert. Eine im Filtrat manchmal nachträglich noch auftretende Trübung von $ZnCO_3$ wird durch Filtrieren entfernt und dieses Filtrat schließlich mit verdünnter Essigsäure bis zu schwach saurer Reaktion versetzt.

Durch die wiederholte Behandlung der Rückstände mit Alkohol wächst die Flüssigkeit schließlich auf etwa 6 *l* an, die im Vakuum bei 40—50° bis auf etwa 500 *cm*³ eingeengt werden. Diese Lösung fällt man mit Bleiessig und Ammoniak, um alle störenden Körper möglichst zu entfernen. Der in H_2O suspendierte Niederschlag, in dem der größte Teil des Zuckers und die zu isolierende Glukuronsäure in gepaarter Form übergehen, wird mit H_2S zerlegt.

Nach der Abtrennung des ausgeschiedenen Bleisulfids und der Entfernung des überschüssigen H_2S durch einen Luftstrom engt man die Lösung wieder im Vakuum bis auf etwa 1/3 des Volums vor dem Zusatz von Bleiessig und Ammoniak ein. Diese Lösung erhitzt man unter Zusatz von so viel konzentrierter H_2SO_4, daß eine etwa 1%ige Lösung entsteht, etwa 1 Stunde im Autoklaven, um die Glukuronsäure aus ihren gepaarten Verbindungen in Freiheit zu setzen. Man neutralisiert alsdann genau mit Na_2CO_3, versetzt mit einem Überschuß von p-Bromphenylhydrazinazetat (in unserem Falle etwa 3 *g*) und erwärmt im kochenden Wasserbad unter möglichster Vermeidung von Luftzutritt.[1]) Dies erreicht man am einfachsten dadurch, daß man über das in das Wasserbad gehängte Becherglas eine Glasschale stülpt, so daß der über der Flüssigkeit befindliche Raum hauptsächlich von Wasserdämpfen erfüllt ist.

Nach etwa 10 Minuten langem Erwärmen beginnt die Ausscheidung von Kristallen, die man nach dem Erkalten der Lösung an der Pumpe absaugt und mit absolutem Alkohol so lange wäscht, bis dieser farblos ab-

[1]) Es ist dies notwendig, weil die p-Bromphenylhydrazinverbindung der Glukuronsäure bei Wasserbadtemperatur gegen Sauerstoff empfindlich ist. Weiter ist zu beachten, daß die freie Glukuronsäure namentlich in warmer Lösung gegen Säuren sehr empfindlich ist und man muß deshalb einen Überschuß an freier Essigsäure vermeiden. Das erreicht man am besten durch Anwendung von p-Bromphenylhydrazinchlorhydrat und der eben erforderlichen Menge Natriumazetat.

läuft. Die auf dem Filter bleibende, prachtvoll lichtgelbe Verbindung charakterisiert sich durch ihren Schmelzpunkt (227—229°) und ihre Unlöslichkeit in Alkohol als glukuronsaures p-Bromphenylhydrazin.

Fruktose.

Von Monosacchariden scheint außer Glukose nur noch Fruktose im Blut enthalten zu sein.

Zum Nachweis von Fruktose im Blut verfuhren *Neuberg* und *Strauss*[1]) folgendermaßen:

Das Blut wird sofort nach dem Austritt aus dem Körper mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaktion versetzt und aufgekocht. Dabei koaguliert die Hauptmenge des vorhandenen Eiweißes, man filtriert die Koagula ab und engt das klare Filtrat, das deutlich sauer reagieren muß, im Vakuum bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur bis zum dünnen Sirup ein; die Reaktion muß auch während des Eindampfens sauer bleiben. Der dünnflüssige Verdampfungsrückstand wird dann, unbekümmert um feste Ausscheidungen, die aus Salzen oder Albumin bestehen, mit halb soviel Alkohol von 98%, wie das ursprüngliche Flüssigkeitsvolum betrug, auf dem Wasserbade ausgekocht. In etwa 5 Minuten wird die Hauptmenge der vorhandenen Fruktose ausgezogen; die erkaltete Lösung wird filtriert und das Auskochen mit Alkohol nach Befeuchten des Rückstandes mit wenig Wasser wiederholt.

Die vereinigten alkoholischen Auszüge werden nach eventuellem nochmaligen Filtrieren mit Tierkohle entfärbt. In einem aliquoten Teil bestimmt man die Menge reduzierender Substanz und berechnet sie auf Lävulose. Den Hauptteil der alkoholischen Flüssigkeit engt man ein, setzt die für Lävulose berechneten 3 Moleküle Methylphenylhydrazin zu, läßt einige Stunden stehen und filtriert, wenn sich ein Niederschlag gebildet hat. Dann fügt man dem Filtrat bzw. der ursprünglichen Lösung die der angewandten Methylphenylhydrazinmenge gleiche Gewichtsmenge 50%ige Essigsäure zu und eventuell noch so viel Alkohol, bis die Flüssigkeit ganz klar ist. Diese wird schließlich 3—5 Minuten auf kochendem Wasserbad oder besser 24 Stunden auf 40° erwärmt.

Bei größeren Mengen Fruktose erhält man das Osazon direkt kristallinisch, eventuell nach Zusatz weniger Tropfen Wasser.

Bei geringen Mengen erhält man zunächst ein Öl, das beim Reiben fest wird. Am sichersten kommt man durch starke Abkühlung (Kältemischung aus festem CO_2 und Äther) zum Ziel. Zu diesem Zweck trennt man das Öl von der Mutterlauge, dekantiert es mit Wasser und trocknet es im Vakuum über H_2SO_4. Dann löst man es in absolutem Alkohol, filtriert und stellt die Lösung in die Kältemischung, wobei sofort die Ausscheidung von Kristallen beginnt. Man saugt ab, wascht mit kaltem (Kälte-

[1]) *C. Neuberg* und *Strauss*, Über Vorkommen und Nachweis von Fruchtzucker in den menschlichen Körpersäften. Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**. 232 (1902).

mischung!) Alkohol und kristallisiert aus heißem Wasser unter Zusatz von etwas Pyridin um.

Beim Einengen erhält man das Osazon in sehr feinen gelblichen Nadeln von F. P. 158—160°.

Tierisches Gummi.

Von Polysacchariden ist von *Freund*[1]) sogenanntes tierisches Gummi aus Blut in folgender Weise erhalten worden:

4 *l* Ochsenblut werden unter Benutzung von $ZnCO_3$ enteiweißt, der Niederschlag abfiltriert, mehrmals mit heißem Wasser aufgekocht, gewaschen und das Filtrat samt Waschwasser bei möglichst niederer Temperatur auf 1 *l* eingedampft. Man fällt dann nach den Angaben von *Landwehr*[2]) mit $CuSO_4$ und NaOH das tierische Gummi aus, filtriert die Fällung ab, wäscht sie gut aus, löst sie in verdünnter Salzsäure und versetzt diese Lösung so lange mit NH_3, als der Niederschlag von $Cu(OH)_2$ sich noch löst; dann fügt man 3 Volumina 95%igen Alkohol zu und erwärmt auf 60°. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Alkohol gewaschen, in leicht mit Salzsäure angesäuertem Wasser gelöst, nochmals mit Alkohol gefällt und dann mit Alkohol und Äther gewaschen. Man erhält so ein gelblichweißes Pulver, das sich in H_2O vollkommen klar löst, Reduktionsfähigkeit aber erst nach dem Kochen mit Säuren zeigt.

4. Extraktivstoffe.

a) N-haltige Extraktivsubstanzen.

Harnstoff.

Zur Isolierung von Harnstoff aus Serum oder Blut verfährt man nach *Hoppe-Seyler*[3]) folgendermaßen:

Frisches Blut wird mit dem 3—4fachen Volum starken Alkohols gut gemischt und diese Mischung 24 Stunden stehen gelassen. Man filtriert nach dieser Zeit, wäscht den Rückstand mehrere Male mit Alkohol und engt Filtrat und Waschalkohol bei mäßig hoher Temperatur, am besten im Vakuum, ein. Die erkaltete Lösung säuert man dann mit Essigsäure stark an, schüttelt sie mit Chloroform zur Entfernung von Fett, Phosphatiden, Cholesterinestern, Seifen etc. aus, wäscht die Chloroformlösung mit Wasser und engt Hauptflüssigkeit und Waschwasser zur Entfernung von

[1]) *Freund*, Über das Vorkommen von tierischem Gummi im normalen Blut. Zentralbl. f. Physiol. 6. 345 (1892).

[2]) *E. Landwehr*, Ein neues Kohlehydrat im menschlichen Körper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 8. 122/128 (1883/84).

Man fügt zu der alkalischen Lösung $CuSO_4$, so lange als das gebildete $Cu(OH)_2$ sich noch löst; beim Kochen dieser Lösung scheidet sich die basische Cu-Verbindung in bläulichweißen Flocken aus.

[3]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch der physiol. u. pathol.-chem. Analyse. 8. Aufl. 1909. S. 651.

Alkohol stark ein. Dann macht man mit H_2SO_4 stark sauer und versetzt zur Entfernung von Eiweißresten, Kreatinin und eventuell vorhandenen Basen mit Phosphorwolframsäure[1]), so lange noch ein Niederschlag entsteht. Der Niederschlag ist mit H_2SO_4haltigem Wasser zu waschen; die vereinigten Filtrate werden mit Barytwasser übersättigt, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen und aus dem Filtrat der Überschuß an Baryt durch Kohlensäure entfernt. Man filtriert vom $BaCO_3$ ab, engt das Filtrat bei mäßiger Wärme auf ein kleines Volum ein und fällt den Harnstoff mit Merkurinitrat, wobei man zum Neutralisieren der frei werdenden Salpetersäure Baryt verwendet; die Flüssigkeit soll stets sauer bleiben. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser (wenig) gewaschen, in Wasser zerteilt und durch H_2S zerlegt. Nach der Entfernung des Quecksilbersulfids vertreibt man aus dem Filtrat, das neben salpetersaurem Harnstoff höchstens noch geringe Mengen $Ba(NO_3)_2$ enthalten soll, durch Erwärmen auf dem Wasserbad oder durch Luftdurchleiten durch die Lösung den H_2S, versetzt die Lösung mit Baryumkarbonat, solange noch eine Umsetzung stattfindet, filtriert und dampft die Lösung bei mäßiger Temperatur zur Trockene ein. Den Rückstand zieht man mit absolutem Alkohol aus, setzt der filtrierten Lösung ein gleiches Volum Essigäther (zur Entfernung von eventuell gelöstem $Ba(NO_3)_2$ zu, filtriert wieder und läßt die Lösung verdunsten. Durch wiederholtes Auflösen des Rückstandes in absolutem Alkohol und Versetzen dieser Lösung mit Essigester erhält man den Harnstoff schließlich vollkommen rein und kann ihn, wenn man unter Einhaltung quantitativer Kautelen gearbeitet hat, zur quantitativen Bestimmung auf gewogenem Filter zur Wägung bringen.

Salkowski[2]) isoliert den Harnstoff in Form der Verbindung mit Salpetersäure in folgender Weise:

Man fällt das Blut mit der mehrfachen Menge absoluten Alkohols, verdunstet den Auszug, mit dem man den Waschalkohol vereinigt hat, bei gelinder Wärme zur Trockene, nimmt den Rückstand in absolutem Alkohol auf und verdunstet nach dem Filtrieren abermals zur Trockene. Aufnehmen in absolutem Alkohol und Wiederverdunsten haben so oft zu geschehen, bis der Rückstand sich vollkommen klar in absolutem Alkohol löst, zum Zeichen, daß alle anorganischen Salze, vor allem Kochsalz, vollkommen entfernt sind. Man verdunstet dann ein letztes Mal und gibt zu dem Rückstand nach starkem Abkühlen Salpetersäure.[3]) (D 1, 2.) Nach 24 Stunden wird der Niederschlag auf einem glatten Filter gesammelt und mit eiskalter Salpetersäure gewaschen; die überschüssige Salpetersäure

[1]) Die Phosphorwolframsäure muß natürlich darauf hin geprüft sein, ob sie nicht am Ende Harnstoff ebenfalls fällt.

[2]) *E. Salkowski,* Über den Nachweis und die Bestimmung von Harnstoff in Körperflüssigkeiten und Organen. Arbeiten aus dem path. Institut zu Berlin. Berlin, Hirschwald, 1906. 581.

[3]) Die Salpetersäure muß durch Auskochen von niederen Oxyden des Stickstoffs befreit sein.

entfernt man am besten, indem man das Filter auf Filtrierpapier legt. Man bringt dann das Filter in den Trichter zurück, wäscht zur Entfernung von Fett und Fettsäuren mit absolutem Alkohol und Äther und kann nach dieser Behandlung das Harnstoffnitrat auf dem Filter zur Wägung bringen.

Zur Kontrolle, ob das Harnstoffnitrat frei ist von anorganischen Salzen, verascht man das Harnstoffnitrat (ganz oder nur einen aliquoten Teil) vorsichtig in einem Platintiegel, wobei ein Rückstand nicht bleiben darf; bleibt ein merklicher Rückstand, so führt man ihn mit H_2SO_4 oder HCl in Sulfat oder Chlorid über und bringt das hieraus auf $NaNO_3$ berechnete Gewicht in Abzug.

Beide oben aufgeführten Verfahren sind recht zeitraubend und erfordern große Sorgfalt, sobald es sich um quantitative Bestimmungen handelt. Man kann für diese Zwecke aber auf eine Reindarstellung des Harnstoffes verzichten und im Anschluß an *Schöndorff*[1]) in folgender Weise verfahren.

Verfahren nach *Schöndorff:*

1 Volumen Blut wird mit 2 Volumina Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung versetzt und geschüttelt. (Die Phosphorwolframsäure-Salzsäuremischung ist hergestellt aus 1 Volumteil konzentrierter HCl D 1·124 und 9 Volumteilen 10%iger Phosphorwolframsäurelösung, die natürlich Harnstoff nicht fällen darf.) Nach 5 Minuten wird eine Probe abfiltriert und nochmals mit 1 Volumen Säuremischung versetzt; bleibt die Probe 2 Minuten klar, so ist die Fällung vollständig, andernfalls hat man der ganzen Lösung noch ein 3. Volum Säuremischung zuzugeben. Im allgemeinen reicht man mit 2 Volumina Säuremischung aus. Die Mischung wird nach 24 Stunden filtriert und das Filtrat (Filtrat I) mit soviel Kalziumhydroxydpulver[2]) in einer Reibschale zerrieben, bis die Masse alkalisch reagiert; man filtriert wieder (Filtrat II). Sollte die Flüssigkeit beim Zerreiben mit Kalziumhydroxyd eine blaue Farbe annehmen, so wartet man mit dem Filtrieren, bis diese Farbe wieder verschwunden ist, was oft mehrere Stunden dauert.

Zur Bestimmung des aus dem Harnstoff entstehenden NH_3 wägt man auf einer Schnellwage 10 *g* kristallisierte Phosphorsäure ab, bringt sie in ein Erlenmeyerkölbchen, läßt hierzu aus einer Bürette eine entsprechende Menge des Filtrates II laufen und erhitzt in einem Trockenschrank $4^1/_2$ Stunden auf 150°. Nach dem Erkalten wird die am Boden befindliche sirupartige Masse in warmem Wasser gelöst, die Lösung in einem Destillierkolben übergespült und das gebildete NH_3 nach Zusatz von NaOH

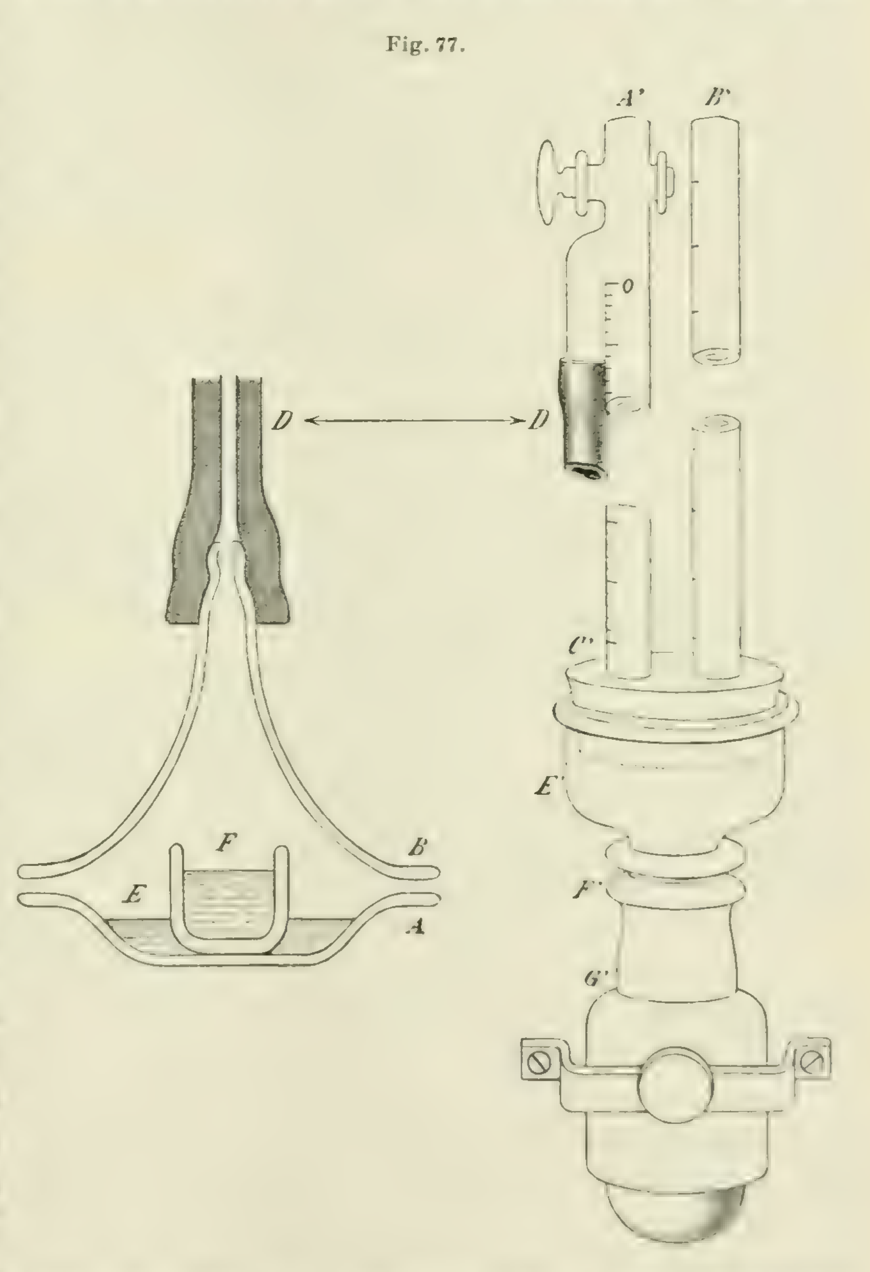
[1]) *B. Schöndorff*, Eine Methode der Harnstoffbestimmung in tierischen Organen und Flüssigkeiten. *Pflügers* Archiv. 62. 1—57 (1896).

[2]) Dieses Pulver erhält man in der Weise, daß man gebrannten Kalk mit soviel Wasser versetzt, daß er zu einem feinen Pulver zerfällt. Man zerreibt und trocknet unter Abschluß von Luft.

und Talk in vorgelegte titrierte Schwefelsäure überdestilliert. Die überschüssige H_2SO_4 titriert man unter Verwendung eines geeigneten Indikators (Lakmoid-Malachitgrün) mit Lauge zurück.

Ist man vor die Aufgabe gestellt, in kleinen Blutmengen — wenigen Kubikzentimetern — den Harnstoffgehalt zu bestimmen, so wird man sich mit gutem Erfolg der Methode von *Barcroft*[1]) bedienen, die in folgendem beschrieben ist.

Fig. 77.



Die Methode beruht auf der schon früher für ähnliche Zwecke verwendeten Zersetzung von Harnstoff (und Ammonsalzen) durch unterbromigsaure Salze.

Das Blut — 1 cm^3 genügt vollkommen — läßt man in das 50fache Volum absoluten Alkohols einfließen. Nach 24stündigem Stehen filtriert man die Lösung in die Schale *A* (siehe Fig. 77), die etwa 5 *cm* Durchmesser hat und 5 *mm* tief ist. Man setzt die Schale auf ein Wasserbad und läßt den Alkohol bei etwa 65° verdunsten; sind die ganzen 50 cm^3 in die Schale filtriert, dann läßt man den Niederschlag mit 20 cm^3 Alkohol einige Zeit stehen, filtriert und vereinigt dieses Filtrat mit dem ersten. Auf diese Weise ist man sicher, allen Harnstoff auszuziehen. Man läßt die Flüssigkeit dann vollständig verdunsten, löst den Rückstand in 1 cm^3 40°/₀iger NaOH, wonach alles zur Bestimmung fertig ist. Die Bestimmung selber erfolgt in dem aus der nebenstehenden Figur ersichtlichen Apparat.

[1]) *J. Barcroft*, The estimation of urea in blood. Journ. of Physiol. 29. 181/87 (1903).

A ist die eben schon erwähnte Schale, auf deren Rand der Deckel *B* gut aufgeschliffen ist; dieser Deckel trägt in der Mitte oben eine Öffnung und einen Ansatz zur Befestigung eines Kautschukschlauchs, der in der aus der Figur ersichtlichen Weise mit der Manometerröhre *A'* in Verbindung steht. Der Manometerschenkel *A'* ist in Kubikzentimeter geteilt; das Kaliber der Röhre ist so eng, daß 1 cm^3 eine Länge von 25—30 *cm* einnimmt; jeder Teilstrich entspricht $^1/_{100}$ cm^3; mit Leichtigkeit kann man noch $^1/_4$ dieser Teilung abschätzen. Der Nullpunkt dieses Schenkels *A'* ist oben ein Stück unterhalb des Hahns. Der Schenkel *B'* des Manometers ist in Millimeter geteilt. Da Stickstoff in Wasser[1]) nur ganz wenig löslich ist, kann man die Unterschiede der Gasvolumina bei gleichbleibendem Druck feststellen.

Die beiden Manometerröhren sind in einen doppelt durchbohrten Stopfen eingelassen, der in ein Glasgefäß *E'*, dessen Form aus der Figur ersichtlich ist, eingesetzt ist. Am unteren Ende von *E'* ist die Kautschukkappe *F'* angebracht, über welcher sich eine Schraube mit Platte *G'* findet, die gestattet, die Kautschukkappe stärker oder schwächer zusammenzudrücken und dadurch den Stand der Absperrflüssigkeit zu ändern. Ein Teil der Manometerröhren, ferner *E'* und *F'* sind mit der Absperrflüssigkeit vollkommen angefüllt, wobei sorgfältig darauf zu achten ist, daß nirgends Luftbläschen hängen bleiben.

Die Eichung des Apparates geschieht am besten in der Weise, daß man, wie bei einem Versuch, eine genau bekannte Menge Harnstoff zersetzt und feststellt, wieviel Kubikzentimeter N geliefert werden; es ist dies deshalb zweckmäßig, weil bei der Zersetzung von Harnstoff durch unterbromigsaure Salze bekanntlich nie 100% des N als solcher in Freiheit gesetzt werden, sondern nur rund 92%.

Die weitere Ausführung der Bestimmung gestaltet sich folgendermaßen. Nachdem man den in *A* befindlichen Rückstand in 1 cm^3 40%iger NaOH gelöst und in die Lösung das Gefäß *F* mit etwa 0·5 cm^3 Bromlauge gestellt hat, setzt man den Deckel *B*, der schon vorher durch *D* mit der Manometerröhre verbunden wurde, auf die Schale *A* und verbindet beide durch passend geformte Federn; der Rand von *A* ist leicht eingefettet. Man bringt dann den Apparat samt einem gleichgebauten und gleichgroßen Kontrollapparat in ein Wasserbad von konstanter Temperatur, schließt dann den Hahn, liest das Volumen in *A'* und den Druck in *B'* ab und läßt dann durch Umkippen von *F* die Reaktion eintreten. Ist die Reaktion zu Ende, so wird bei gleichem Druck in *B'*, wie vor dem Versuch — dies läßt sich leicht mit Hilfe der Schraube *G'* erreichen — das Volumen in *A'* abgelesen und nach Maßgabe der Kalibrierung die Menge des Harnstoffes bestimmt.

Die Methode liefert recht gute Resultate.

[1]) Noch besser ist eine gesättigte Lösung von Chromsäure als Absperrflüssigkeit.

Karbaminsäure.

Daß karbaminsaure Salze im Blut sich finden, hat *Drechsel*[1]) in folgender Weise gezeigt:

150—200 *cm*³ farbloses, klares, durch Zentrifugieren gewonnenes Serum werden mit dem 3fachen Volum käuflichen absoluten Alkohols gefällt. Man filtriert vom ausgeschiedenen Eiweiß ab und versetzt die alkoholische Flüssigkeit mit einer konzentrierten wässerigen Lösung von $CaCl_2$; die anfängliche Trübung ballt sich rasch zu großen Flocken zusammen und wird abfiltriert. Das Filtrat versetzt man mit soviel reiner 20%iger wässeriger KOH-Lösung, bis die Reaktion deutlich alkalisch ist. Dabei entsteht ein kleisterähnlicher Niederschlag, der $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$ und karbaminsauren Kalk enthält. Man filtriert ihn ab, wäscht mit absolutem Alkohol, preßt ihn möglichst zwischen Filtrierpapier ab und trocknet ihn über Schwefelsäure.

Der ganz trockene Niederschlag wird fein zerrieben und in einem luftdicht verschlossenen Gefäß einige Zeit mit destilliertem Wasser geschüttelt. Man läßt absitzen, filtriert und füllt die klare Lösung in eine mit Wasserstoff gefüllte Retorte. Man erhitzt den Retorteninhalt allmählich zum Kochen; dabei läßt man durch eine geeignete Vorrichtung die aus der Retorte abziehenden Gase und Dämpfe durch verdünnte Salzsäure streichen. Der Retorteninhalt trübt sich schon, bevor die Flüssigkeit kocht; die Trübung erweist sich bei näherer Untersuchung als $CaCO_3$; in der vorgelegten Salzsäure findet sich NH_3.

Sowohl das in der Retorte abgeschiedene $CaCO_3$, als auch das in die Vorlage übergehende Ammoniak können zur quantitativen Bestimmung der in der klaren Lösung enthaltenen Karbaminsäure dienen, wobei der Berechnung folgende Reaktionsgleichung zugrunde zu legen ist:

$$Ca(COONH_2)_2 + 2\,H_2O = CaCO_3 + (NH_4)_2CO_3.$$

In neuerer Zeit haben *Mac Leod* und *Haskins*[2]) eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Karbamaten beschrieben, deren Prinzip das folgende ist:

In 1 *cm*³ Blut wird unter Benutzung des Apparates von *Barcroft* und *Haldane* — eine Abbildung findet sich im Bd. 3 dieses Handbuches auf S. 685 — der Gesamtkohlensäuregehalt bestimmt. Einen zweiten Kubikzentimeter desselben Blutes schüttelt man im Wägeglas mit einem Überschuß von NH_4OH-haltiger Baryumhydroxydlösung, dadurch werden die Karbonate gefällt, während die Karbamate in Lösung bleiben. Die gebildeten Karbonate werden entfernt und in der Lösung die Kohlensäure bestimmt. Die Differenz zwischen der ersten und zweiten Bestimmung ergibt die CO_2-Menge, die auf Rechnung der Karbaminsäure zu setzen ist.

[1]) *Drechsel*, Über die Oxydation von Glykokoll, Leuzin, Tyrosin sowie über das Vorkommen von Karbaminsäure im Blut. Journ. f. prakt. Chem. **12**. 417/26 (1875).

[2]) *Mac Leod* and *Haskins*, The quantitative estimation of carbamates. Am. Journ. of Physiol. **12**. 444/56 (1905).

Die Ausführung ist folgende: Das Blut wird direkt aus einem Blutgefäß in einem Zentrifugenglas von 12—16 cm^3 Faßraum aufgefangen. Man gibt etwas Quecksilber in das Glas, verstopft gut und defibriniert durch kräftiges Schütteln. Während man das defibrinierte Blut zentrifugiert, beschickt man 2 Wägegläschen — *A* und *B* — von etwa 25 cm^3 Faßraum mit je 7 cm^3 klarer $Ba(OH)_2$-Lösung, 2 cm^3 ausgekochtem Wasser und 0·5 cm^3 einer 1%igen Chlorbaryumlösung. In jedes Gefäß gibt man dann 1 cm^3 Blutserum und in das Gefäß *A* noch 3·5 cm^3 einer 10%igen Ammoniaklösung. Beide Gefäße werden gut zugestopft, das Gefäß *A* in einem Schüttelapparat geschüttelt und Glas *B* 15 Minuten lang in einem Wasserbad auf 60° erwärmt. Dadurch wird alles Karbamat in Karbonat übergeführt. Dann kühlt man das Gefäß *B* ab, fügt seinem Inhalt noch 3·5 cm^3 10%iges NH_3 zu und schüttelt ebenfalls. Nach je $^1/_2$stündigem Schütteln bringt man den Inhalt jeden Glases in ein Zentrifugengläschen, verstopft gut und zentrifugiert 15—20 Minuten auf einer Zentrifuge mit hoher Tourenzahl.

Von jedem Zentrifugenglas bringt man dann 7 cm^3 (= 0·5 cm^3 Serum) je in ein Gefäß des *Barcroft-Haldane*schen Apparats, gibt eine zur Neutralisierung beinahe hinreichende Menge gesättigter wässeriger Weinsäurelösung hinzu — diese Menge muß durch eine vorherige Titration festgestellt werden — und bringt je 0·25 cm^3 Weinsäure in die Schälchen *H* des Apparates.[1])

Die Gefäße werden mit den Manometern verbunden und die Temperatur an einem $^1/_{10}{}^0$ angebenden Thermometer abgelesen. Ist die Temperatur in den Gefäßen konstant geworden, was durch die Manometer angezeigt wird, dann läßt man die Säure aus den Schälchen in die Flüssigkeit in *A* und *B* einfließen und schüttelt die Gefäße kräftig. Ist alles Gas ausgetrieben, dann senkt man die Gefäße wieder in das Wasserbad, in dem sie vor dem Zugeben der Weinsäure aus den Schälchen sich befanden und läßt sie auf die frühere Temperatur abkühlen. Man liest die Flüssigkeitsmenisken in den Manometern ab und macht die Berechnung folgendermaßen: Die Ablesung an dem Manometer *B* wird abgezogen von der an *A* (da die Gefäße *A* und *B* praktisch den gleichen Faßraum haben, so ist diese Subtraktion statthaft). Die Differenz multipliziert man mit dem Inhalt von Gasgefäßen und Meßröhren. Dieser letztere Wert dividiert durch 10.000[2]) gibt die Anzahl Kubikzentimeter CO_2, die aus Karbamat stammen.

1 cm^3 CO_2 (0°, 760 *mm*) entspricht 0·0036 *g* Kalziumkarbamat (siehe auch Bd. 3 dieses Handbuches, S. 685/88.)

[1]) Siehe Fig. 228, Bd. 3, S. 685. Die eingehende Beschreibung des Apparates und seiner Benutzung ist dort einzusehen.

[2]) Die Flüssigkeit in den Barometerröhren ist eine Lösung von Chromsäure in Wasser von der Dichte 1·030. Wäre Wasser in den Manometerröhren, so wäre der Faktor mit dem zu dividieren, wäre der Barometerdruck in Millimeter Wasserdruck, d. h. die Zahl 10.300. Hat man aber eine Flüssigkeit von oben angegebenem spezifischen Gewicht, so ist nur eine Regulierung der Dezimalen erforderlich.

Kreatin.

Den Nachweis von Kreatin im Blut zu führen ist nicht ganz leicht. Bei Anwendung von viel Serum habe ich mit folgendem Verfahren Erfolg gehabt.[1]) Das Serum wird durch das 3fache Volum 96⁰/₀igen Alkohol gefällt; nach etwa 36 Stunden wird filtriert und der Niederschlag ausgewaschen. Die vereinigten alkoholischen Filtrate werden im Vakuum bei einer Temperatur von etwa 40—45⁰ zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand wird erst mit Äther, dann mit absolutem Alkohol erschöpfend behandelt und das hierbei ungelöst Bleibende mit Wasser geschüttelt, bis dieses nach wiederholtem Erneuern nichts mehr aufnimmt (als Rückstand bleiben Eiweißreste). Die wässerige Lösung wird auf dem Wasserbad bis zur Bildung einer Kristallhaut an der Oberfläche eingeengt; durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure in das Filtrat von dieser kristallinischen Ausscheidung bis zur Sättigung erreicht man die Abscheidung einer großen Quantität anorganischen Materials (vor allem von NaCl[2])). Aus dem Filtrat entfernt man mit Hilfe von Kuprooxyd die Salzsäure und eventuell in Lösung gehendes Cu durch H_2S und engt die Lösung möglichst weit ein, fällt mit Bleiessig und engt das durch H_2S bleifrei gemachte Filtrat nach der Entfernung des PbS zum Verjagen der Essigsäure bis zur Trockene ein. Den Rückstand nimmt man mit Wasser (wenig) auf, versetzt mit Chlorzinklösung und erhält dabei die bekannten warzenförmigen Kristalle von Kreatininchlorzink. Der Weg ist recht mühsam und führt nicht immer zum gewünschten Ziel.

C. Voit gibt an[3]): „Ich habe im Kälberblut kein Kreatinin nachweisen können, doch gelang es nach *Neubauers* Methode, das Kreatin quantitativ zu bestimmen." Nähere Angaben finden sich nicht.

Zur quantitativen Bestimmung des Kreatins verfährt man nach *Mellanby*[4]) folgendermaßen:

Man fällt das Serum mit der etwa 3fachen Menge Alkohol, filtriert die Lösung nach einigem Stehen, wäscht den Niederschlag mit etwa 60⁰/₀igem Alkohol aus und engt die Filtrate bei einer 37⁰ nicht übersteigenden Temperatur bis zur Trockene ein. Den Rückstand nimmt man mit Wasser auf und bestimmt in einem Teil dieser Lösung das eventuell vorhandene Kreatinin nach dem Verfahren von *Folin.*[5]) Einen anderen Teil bringt man nach dem Vorgange von *Gottlieb* und *Stangassinger*[6]) auf

[1]) *Letsche*, Beiträge zur Kenntnis der organischen Bestandteile des Serums. Zeitschr. f. physiol. Chem. 53. 107 (1907).

[2]) Dabei wird allerdings das Kreatin jedenfalls zum Teil, wenn nicht vollständig, in Kreatinin übergeführt.

[3]) *C. Voit*, Über das Verhalten des Kreatins, Kreatinins und Harnstoffs im Tierkörper. Zeitschr. f. Biol. 4. 77/162 (1868).

[4]) *E. Mellanby*, Creatin and Creatinin. Journ. of Physiol. 36. 447/87 (1907/08).

[5]) Eine eingehende Beschreibung dieser Methode siehe dieses Handbuch. Bd. 3, S. 787.

[6]) *R. Gottlieb* und *Stangassinger*, Über das Verhalten des Kreatins bei der Autolyse. Zeitschr. f. physiol. Chem. 52. 1/41 (1907).

einen Gehalt von etwa 22% HCl und erwärmt diese Lösung auf einem lebhaft kochenden Wasserbad etwa 3 Stunden. Dann bringt man die Lösung aus dem Erlenmeyerkölbchen, in dem sie erwärmt wurde, in eine Schale und dampft sie zur Trockene ein. Der Trockenrückstand wird in H_2O gelöst, die Lösung mit natronalkalischer Pikrinsäurelösung versetzt, nach 5 Minuten in einen Meßkolben filtriert und auf das erforderliche Volum verdünnt. Von etwa ausgeschiedenen kohligen Zersetzungsprodukten filtriert man erst vor der Bestimmung ab und führt diese selbst nach den Angaben von *Folin* (siehe oben) aus.

Harnsäure.

Harnsäure scheint als normaler Bestandteil zwar im Blut der Vögel regelmäßig vorzukommen, im Blut der Säugetiere, auch des Menschen, aber zu fehlen. Dagegen tritt sie unter bestimmten pathologischen Umständen bei diesen auf und man führt ihren Nachweis dann in folgender Weise[1]):

Blut — Serum oder Plasma werden genau entsprechend behandelt — wird auf das 3—5fache mit Wasser verdünnt; die Mischung wird mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure (D = 1·0335) eben angesäuert und im kochenden Wasserbad[2]) koaguliert. Man läßt die Mischung etwa 15 bis 20 Minuten im kochenden Wasserbad, bis das Eiweiß in braunen Flocken sich zu Boden setzt, filtriert heiß und kocht den Rückstand wiederholt mit Wasser aus. Die vereinigten Filtrate engt man auf dem Wasserbad ein, filtriert einige neuerlich sich ausscheidende Eiweißflocken ab und fällt aus dieser Lösung die Harnsäure nach dem Verfahren von *Salkowski-Ludwig.*[3])

Hat man von vornherein unter Beobachtung quantitativer Kautelen gearbeitet, so kann das Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure dienen.

Die in Arbeit zu nehmende Blutquantität richtet sich natürlich nach der zu erwartenden Harnsäuremenge.

Schröder hat aus Blut von Gänsen bei Anwendung von nur etwa 60 cm^3 Blut noch 6 *mg* Harnsäure erhalten. *Petren* hat bei Verwendung von etwa 200 cm^3 Menschenblut (von Kranken) noch Harnsäure sicher nachweisen können, während *v. Jaksch* selbst in 300 cm^3 normalem Menschen-

[1]) Das Verfahren ist mit kleinen Abänderungen benutzt worden unter anderen von *Schröder,* Über den Harnsäuregehalt des Blutes und der Leber der Vögel. Beiträge zur Physiol. *C. Ludwig* gewidmet. Leipzig 1887. S. 93. — *K. Petren,* Über das Vorkommen von Harnsäure im Blut bei Menschen und Säugetieren. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **41.** 267/69 (1898). — *v. Jaksch,* Über die klinische Bedeutung des Vorkommens von Harnsäure und Xanthinbasen im Blut, den Exsudaten und Transsudaten. Zeitschr. f. Heilk. Bd. **11.** 415/42 (1890).

[2]) Andere verdünnen stärker (bis zum 10fachen Volum) oder koagulieren durch Kochen auf dem Drahtnetz und fügen die Essigsäure erst der zum Kochen erhitzten Lösung zu.

[3]) Das Verfahren findet sich genau beschrieben: Dieses Handbuch. Bd. **3.** S. 888.

blut keine Spur von Harnsäure mit Hilfe des angegebenen Verfahrens hat finden können.

Brugsch und *Schittenhelm*[1]) bereiten das Blut zur Untersuchung auf Harnsäure und ihrer quantitativen Bestimmung nach dem Verfahren von *Ludwig-Salkowski* oder nach dem Verfahren von *Krüger-Schmid*[2]) in folgender Weise vor:

Das aus einer Vene (oder Arterie) strömende Blut wird mit Ammonoxalat (0·5 *g* auf 200 *cm*³ Blut) aufgefangen. Durch Umrühren mit einem Glasstab sorgt man für innige Mischung des Salzes mit dem Blut und verhindert so die Gerinnung. Man zentrifugiert und hebt das Plasma dann ab. (Will man auch die Blutkörperchen auf Harnsäure untersuchen, so werden sie mit 0·9%iger Kochsalzlösung, der etwas Ammonoxalat zugesetzt ist, gewaschen.) Die Enteiweißung geschieht in der Weise, daß man das Plasma (Serum oder Gesamtblut, auch Blutkörperchen) in das mehrfache Volum kochender ½%iger KH_2PO_4-Lösung einfließen läßt; das Koagulum wird nach dem Abfiltrieren mit heißem Wasser ausgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden auf dem Wasserbad stark eingeengt und diese Lösung zur Bestimmung der Harnsäure verwendet.

Die zweite Art der Enteiweißung, das Blut in etwa 5%ige mit Essigsäure angesäuerte siedende NaCl-Lösung einfließen zu lassen, scheint mir besonders bei Verwendung der *Ludwig Salkowski*schen Methode der Harnsäurebestimmung der großen NaCl-Quantitäten wegen nicht besonders empfehlenswert zu sein.

Für große Blutmengen — mehrere Liter — ist nach *Brugsch* und *Schittenhelm*[3]) folgendes Verfahren zur Enteiweißung zu empfehlen:

Man läßt das Blut in etwa 2—5%ige KOH-Lösung — ein dem anzuwendenden Blut mindestens gleiches Volum — einfließen, erhitzt die Mischung auf dem Drahtnetz zum Kochen und koaguliert durch tropfenweisen Zusatz von verdünnter Essigsäure; will man ganz sicher sein, alle Harnsäure aus dem Koagulum zu entfernen, so trägt man dieses nochmals in etwa 5%ige Kalilauge ein und verfährt nochmals in gleicher Weise wie anfangs. Die Filtrate engt man dann ein und führt den Nachweis oder eventuell die quantitative Bestimmung nach einer der oben angegebenen Methoden zu Ende.

Hypoxanthin.

Von Verbindungen, die der Harnsäure nahestehen, hat *Salkowski* in leukämischem Blut Hypoxanthin nach folgendem Verfahren nachgewiesen.[4])

[1]) *Th. Brugsch* und *A. Schittenhelm*, Zur Stoffwechselpathologie der Gicht. Zeitschrift f. exp. Path. u. Ther. 4. 438/45 (1907).

[2]) Beschreibung der Methode siehe dieses Handbuch. Bd. 3. S. 885. *Brugsch* und *Schittenhelm* geben dieser Methode den Vorzug.

[3]) *Brugsch* u. *Schittenhelm*, Zur Stoffwechselpathologie der Gicht. Zeitschr. f. experim. Path. u. Ther. 4. 438/45 (1907).

[4]) *Salkowski*, Beiträge zur Kenntnis der Leukämie. *Virchows* Archiv. Bd. 50. 174/210 (1870). — Nach der gleichen Methode arbeitete auch *Salomon*, Beiträge zur Lehre von der Leukämie. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1876. 762/77.

Das Blut wurde durch Kochen (ohne irgend welchen Zusatz) koaguliert; dabei wurde die Reaktion schwach sauer. Das Koagulum wurde abfiltriert, mehrmals mit heißem Wasser gewaschen und das Filtrat zuerst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad eingeengt. Die sirupartige Flüssigkeit wurde bei 24stündigem ruhigem Stehen gelatinös, ohne daß eine kristallinische Fällung zu beobachten war. Die Gallerte wurde in wenig Wasser gelöst, man gab dann Alkohol zu, kochte mit dem Alkohol auf, trennte den durch Alkohol hervorgerufenen Niederschlag nach dem Erkalten ab, wusch ihn wiederholt mit Alkohol und engte die alkoholischen Filtrate schließlich bis zum Sirup wieder ein. Dann wurde mit Ammoniak übersättigt, eine Fällung abfiltriert und das Filtrat mit Silbernitrat gefällt. Der Niederschlag wurde ausgewaschen, mit H_2S zerlegt und das Filtrat vom Ag_2S zur Trockene eingedampft. Das gelbliche Pulver löste sich bis auf einen kleinen Rest in verdünnter H_2SO_4. Auch beim Übersättigen dieser Lösung mit Ammoniak entstand kein Niederschlag, also fehlte Harnsäure.

Die ammoniakalische Lösung wurde wieder mit $AgNO_3$ gefällt, der Niederschlag nach dem Auswaschen mit Wasser in Salpetersäure ($D = 1{\cdot}1$) heiß gelöst; beim Abkühlen dieser Lösung schieden sich die charakteristischen Kristalle von Hypoxanthinsilberoxyd aus.

Aminosäuren.

Mit Hilfe der von *Fischer* und *Bergell*[1]) angegebenen Methode ist es gelungen, Glykokoll im normalen Rinderblut nachzuweisen und die Gegenwart einer anderen Aminosäure wahrscheinlich zu machen. Man verfährt folgendermaßen[2]):

Möglichst frisches Rinderblut (5 *l*) wird mit der gleichen Menge H_2O, der doppelten Menge 2%iger HCl und der doppelten Menge 5%iger Sublimatlösung versetzt. Der Eiweißniederschlag wird nach kurzem Stehen abgesaugt, das Filtrat durch H_2S vom Hg befreit und der überschüssige H_2S durch einen Luftstrom verjagt. Das Filtrat wird genau neutralisiert und dann je 6 *l* Filtrat (= 1 *l* Blut) im Vakuum bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers auf 500 *cm*³ eingeengt. Man fügt jetzt diesen 500 *cm*³ Lösung soviel 33%ige Natronlauge zu, daß rotes Lackmuspapier kräftig gebläut wird (etwa 15 *cm*³), saugt die sich hierbei ausscheidenden Phosphate ab und schüttelt nunmehr die völlig klare, in dicker Schicht gelbliche Flüssigkeit mit etwa 100 *cm*³ einer 5%igen ätherischen β-Naphtalinsulfochloridlösung 9 Stunden lang. Von 3 zu 3 Stunden wird die Reaktion der Lösung geprüft und falls eine Abschwächung der alkalischen Reaktion eingetreten ist, wieder etwas $NaOH$ zugefügt. Man

---

[1]) *E. Fischer* und *P. Bergell*, Über die β-Naphtalinsulfoderivate der Aminosäuren. Berichte der Deutsch. Chem. Gesellsch. 35. III. 3779 (1902).

[2]) *A. Bingel*, Über die Gewinnung von Glykokoll aus normalem Blut. Zeitschr. f. physiol. Chem. H. S. **57**. 384 (1908).

trennt den Äther ab, filtriert die wässerige Lösung, säuert mit HCl an und schüttelt die sich hierbei bildende starke Fällung mit Äther aus. Der Äther wird mit H_2O gewaschen, nach Zusatz von wenig Wasser abdestilliert und der gelbe ölige Rückstand mit NH_3 bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Ungelöst bleibt das Amid der β-Naphtalinsulfosäure, das man durch 2—3maliges Ausschütteln mit Äther entfernt. Aus der schwach ammoniakalischen wässerigen Lösung scheidet man durch HCl die Naphtalinsulfoverbindungen ab, schüttelt sie mit Äther aus, wäscht die Ätherlösung mit Wasser und destilliert schließlich den Äther nach Zugabe von wenig Wasser ab. Der Rückstand wird mit Wasser auf etwa 30 cm^3 gebracht, auf dem Wasserbad erwärmt und das Ungelöste abfiltriert. Das erkaltende Filtrat wird mit β-Naphtalinsulfoglykokoll geimpft; die Ausscheidung erfolgt dann rasch und wird im Eisschrank vervollständigt.

Der bei der ersten Behandlung mit Wasser ungelöst bleibende Rückstand wird ein zweites und eventuell noch ein drittes Mal mit wenig Wasser erwärmt und heiß filtriert.

Durch wiederholtes Umkristallisieren ist das β-Naphtalinsulfoglyzin zu reinigen.

Bemerkenswert ist, daß das von Amid befreite Rohprodukt in alkoholisch-ammoniakalischer Lösung die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts dreht. Es enthält also das Rohprodukt zweifellos die Naphtalinsulfoverbindung entweder einer höheren Aminosäure oder einer polypeptidartigen Substanz.

Weniger glücklich als *Bingel* war *Howell*[1], der ebenfalls die β-Naphtalinsulfochloridmethode anwandte, zur Enteiweißung aber ein Verfahren benutzte, das in anderen Fällen vielleicht gute Dienste leisten kann. Er trennt die Aminosäuren durch Dialyse ab und verwendet dazu Kollodiummembranen, die er in folgender Weise herstellt:

Man stellt sich eine etwa 5—6%ige Lösung von Schießbaumwolle in einem Gemisch von gleichen Teilen absolutem Alkohol und Äther her und gießt die Lösung in einen Erlenmeyerkolben von dem Faßraum, den die Membran etwa haben soll (*Howell* wandte solche mit 250 cm^3 Inhalt an). Unter gleichmäßigem Rotieren des Kolbens verteilt man die Lösung über die innere Oberfläche des Kolbens und läßt unter beständigem gleichmäßigem Drehen den Überschuß wieder ausfließen. Das Drehen muß einige Minuten fortgesetzt werden, bis die Schicht, welche die Glaswandung bedeckt, oberflächlich trocken geworden ist. Die Flasche wird jetzt mit Wasser gefüllt, die Membran am Kolbenhalsrand mit Hilfe eines Messers abgelöst und mit Hilfe eines Glasstabes oder eines Spatels vorsichtig auch ein Stück weit von der Wandung des Halses losgelöst. Man entleert jetzt die Flasche und kann die ganze Membran bequem loslösen, dadurch, daß man einen Wasserstrom zwischen Glaswand und Membran fließen läßt.

[1]) *W. H. Howell*, Note upon the presence of amido acids in the blood and lymphe as determined by the β-Naphtalinsulfochloride reaction. Am. Journ. of Physiol. **17**. 273/79 (1906/07).

Ist die Membran auf diese Weise losgelöst, so läßt sie sich, ohne Schaden zu nehmen, aus dem Kolben herausziehen; bis zum Gebrauch bewahrt man sie unter Wasser auf. Für die Dialyse kittet man in die Öffnung dieser „Kollodiumflasche" mit Hilfe von Kollodium eine Glasröhre von 30 bis 40 *cm* Länge und sichert diese Verbindung durch Umwickeln mit Bindfaden. (Das Rohr hat den Zweck, zu verhindern, daß beim Zunehmen der Flüssigkeitsmenge in der „Flasche" infolge des osmotischen Druckes der Inhalt überfließt.)

Die „Flasche" beschickt man mit Blut oder Serum, hängt sie in ein Gefäß mit 2—4 *l* Wasser und dialysiert 5—24 Stunden. Das Dialysat, in dem die Aminosäuren sich finden müssen, engt man auf 50—100 cm^3 ein und benutzt die eingeengte Flüssigkeit direkt für die Reaktion mit β-Naphtalinsulfochlorid.[1]) Zur Entfernung der Aminosäuren aus dem Serum (Blut) genügt es, 5—6 Stunden zu dialysieren; dialysiert man länger, so trübt sich die sonst klare Flüssigkeit infolge des Durchtrittes von etwas Globulin.

Aus Serum von einem Fall von akuter Leberatrophie haben *Neuberg* und *Richter* Leucin und Tyrosin in folgender Weise isoliert.[2])

Das abgehobene Serum ließ beim Stehen im Eisschrank über Nacht Tyrosin in beinahe vollkommen reinem Zustande ausfallen. Das Filtrat dieser spontanen Kristallisation wird mit Essigsäure bis zu eben wahrnehmbarer saurer Reaktion versetzt und diese Flüssigkeit in etwa das 5fache Volumen kochend heißen Wassers einfließen gelassen, und zwar nur so rasch, daß das Kochen nicht unterbrochen wird. Man filtriert, wäscht das Koagulum mit heißem Wasser aus und engt die vereinigten Filtrate auf etwa 20 cm^3 ein. Dieser vollkommen eiweißfreie Sirup ist nach 48 Stunden zu einem Kristallbrei von vorwiegend Leucin und wenig Tyrosin erstarrt. Man rührt den Brei mit 10 cm^3 Eiswasser an und saugt die Kristalle ab. Tyrosin und Leuzin werden durch kochenden Alkohol getrennt, wobei Leuzin in den Alkohol geht und beim Verdunsten des Alkohols in reinem Zustande zu erhalten ist. Das Filtrat von Leuzin und Tyrosin wird nach dem Verfahren von *Kossel* und *Kutscher*[3]) auf Lysin, Arginin und Histidin untersucht, wobei sich das Vorhandensein von Lysin in ziemlich reichlicher Menge und das Fehlen von Arginin und Histidin ergab.

Proteinsäuren.[4])

Zu den N-haltigen Extraktivsubstanzen sind schließlich auch noch die Proteinsäuren, deren Nachweis und Isolierung aus dem Blut in folgender Weise gelungen ist, zu rechnen.

---

[1]) Die weitere Verarbeitung ist die gleiche wie bei *Bingel*.

[2]) *Neuberg* und *Richter*, Über das Vorkommen von freien Aminosäuren im Blut bei akuter Leberatrophie. Deutsche med. Wochenschr. 1904. S. 499.

[3]) *A. Kossel* und *Fr. Kutscher*, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 31. 165 (1900).

Eine genaue Beschreibung der Methode samt ihren Verbesserungen findet sich in diesem Handbuch. Bd. 2. S. 498 ff.

[4]) *Browinski*, Über die Gegenwart von Proteinsäuren im Blut. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 58. 134/46 (1908).

Defibriniertes Pferdeblut wird zur Abtrennung der Formelemente ausgeschleudert. Das abgehobene Serum verdünnt man mit dem gleichen Volum Wasser, säuert mit Essigsäure an und entfernt durch Hitzekoagulation die Eiweißkörper. Der Eiweißniederschlag wird kolliert, ausgepreßt und mit Wasser nochmals aufgekocht. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeengt, die eingeengte Flüssigkeit nochmals unter Zusatz von etwas Essigsäure aufgekocht und wieder filtriert. Sind die eben erwähnten Manipulationen richtig ausgeführt, so enthält die Flüssigkeit nur noch Spuren von Eiweiß. Die aus etwa 100 *l* Serum erhaltene Flüssigkeit wird bei essigsaurer Reaktion solange mit Quecksilberazetat versetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Dieser Niederschlag (I) enthält Urochrom und Antoxyproteinsäure.

Das Filtrat dieses Niederschlags wird mit Soda und Quecksilberazetat bis zum Auftreten von gelbem Quecksilberoxyd versetzt: Niederschlag II enthaltend Oxy- und Alloxyproteinsäure.

Niederschlag I wird durch H_2S zerlegt, das HgS abfiltriert und der H_2S-Überschuß durch einen Luftstrom verdrängt.

Durch $Ca(OH)_2$ fällt man die Phosphorsäure, entfernt den Kalküberschuß durch Kohlensäure und engt das Filtrat von $CaCO_3$ bis zum Sirup ein. Diesen gießt man in viel 96%igen Alkohol, filtriert den Niederschlag nach 24 Stunden ab und löst ihn in etwa $^1/_2$ *l* Wasser. Man säuert mit Essigsäure an und fügt Kupferazetat zu, solange noch ein Niederschlag entsteht. Dieser grünbraune Niederschlag (A) wird abfiltriert; das Filtrat hiervon gibt nach vorsichtigem Neutralisieren mit Ammoniak nach mehreren Stunden einen hellgrünen Niederschlag (B), dessen Filtrat (C) zur Untersuchung auf Antoxyproteinsäure dient.

Die beiden Niederschläge A und B werden durch H_2S von Kupfer befreit und aus dem Filtrat vom CuS der Schwefelwasserstoff verjagt. Die Lösungen enthalten nach Ausweis der Reaktionen beide Urochrom.

Auf Antoxyproteinsäure wird das Filtrat (C) in folgender Weise untersucht. Das Kupfer entfernt man durch H_2S, den Überschuß an letzterem aus dem Filtrat vom CuS durch einen Luftstrom und fällt den Kalk mit Oxalsäure. Aus dem Filtrat vom Kalziumoxalat zieht man durch Äther die Essigsäure aus, die essigsäurefreie Lösung schüttelt man zur Entfernung eventuell mitgerissener Säuren der Alloxyproteinsäuregruppe mit frisch gefälltem Bleihydroxyd, das Filtrat wird durch Baryt von überschüssigem Blei und das neuerliche Filtrat durch Kohlensäure von überschüssigem Baryt befreit. Das Filtrat vom $BaCO_3$ wird im Vakuum eingeengt und aus dieser Lösung das Baryumsalz der Antoxyproteinsäure durch Zusatz von Alkohol gefällt. Zu weiterer Reinigung löst man das Baryumsalz in H_2O, versetzt die Lösung mit der zur Ausfällung des Baryums eben notwendigen Menge von Na_2SO_4, fällt mit $AgNO_3$ vorsichtig das in der Lösung sich findende Chlor aus und fügt dann zur Ausfällung der Antoxyproteinsäure als Silbersalz $AgNO_3$ zu.

Zur Untersuchung auf Oxy- und Alloxyproteinsäure wird der wie oben beschrieben erhaltene Niederschlag II verwendet.

Durch H_2S entfernt man das Quecksilber; aus dem Filtrat vom HgS verjagt man den Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom und gibt zu der Lösung $Ba(OH)_2$; den Überschuß entfernt man durch Kohlensäure und fügt zum Filtrat vom $BaCO_3$ Bleiessig, wodurch Alloxyproteinsäure gefällt und von Oxyproteinsäure getrennt wird.

Der Bleiniederschlag wird mit Oxalsäure (soviel bis Kongopapier blau wird) zersetzt; dem Filtrat fügt man $Ba(OH)_2$ zu, entfernt den Überschuß an letzterem durch Kohlensäure und engt das Filtrat vom $BaCO_3$ auf wenige Kubikzentimeter ein. Durch Eintragen dieser Lösung in starken Alkohol wird alloxyproteinsaures Baryum gefällt, das man wie oben bei der Antoxyproteinsäure beschrieben in das Silbersalz überführt.

Aus dem Filtrat vom Bleiniederschlag der Alloxyproteinsäure, das die Oxyproteinsäure enthalten muß, fällt man durch Na_2CO_3 das Blei; zum Filtrat vom basischen Bleikarbonat fügt man Quecksilberazetat bis zum Gelbwerden (von HgO) der Fällung. Dieser Niederschlag wird in der bei der Antoxyproteinsäure beschriebenen Weise in das Baryumsalz und dieses in das Silbersalz übergeführt.

Über die Charakterisierung dieser Säuren ist die von *Rona*[1]) in diesem Handbuch gegebene Darstellung nachzusehen.

Dort findet sich auch eine Methode beschrieben zur quantitativen Bestimmung der Proteinsäuren im Blute.[2])

b) N-freie Extraktivsubstanzen.

Milchsäure.

Zur Isolierung und gleichzeitigen quantitativen Bestimmung von Milchsäure im Blut verfahren *Saito* und *Katsuyama*[3]) folgendermaßen:

Das gewogene Blut wird mit dem 6fachen Volumen 96%igen Alkohols versetzt und nach 12stündigem Stehenlassen unter zeitweisem Umrühren abfiltriert. Der Rückstand wird noch 4—5mal mit Alkohol (96%) ausgezogen und ausgepreßt.

Aus den vereinigten Alkoholauszügen wird der Alkohol abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, mit einigen Tropfen Sodalösung schwach alkalisch gemacht und zur Entfernung der Fette etwa 5mal mit Äther geschüttelt. Die entfettete Flüssigkeit wird mit dem gleichen Volum mäßig verdünnter Phosphorsäure angesäuert und 6mal mit dem 5fachen Volum Äther geschüttelt. Der nach dem Abdestillieren des Äthers zurückbleibende Sirup wird mit Barytwasser neutralisiert, ein

[1]) Dieses Handbuch. Bd. 3. S. 819 (1910).

[2]) Dieses Handbuch. Bd. 3. S. 823 (1910).

[3]) *Saito* und *Katsuyama*, Beiträge zur Kenntnis der Milchsäurebildung im tierischen Organismus bei Sauerstoffmangel. Zeitschr. f. physiol. Chem. 32. 214/30 (S. 217) (1901).

hierbei entstehender Niederschlag abfiltriert und ausgewaschen. Die gesamten Filtrate werden nach dem Ausfällen des Baryts mit verdünnter H_2SO_4 auf dem Wasserbad konzentriert und mit Äther erschöpft. Von den klar abgegossenen Ätherextrakten wurde der Äther abdestilliert, der Rückstand mit Wasser und überschüssigem Zinkoxyd gekocht, heiß filtriert und gut ausgewaschen. Die filtrierte Lösung wurde in einem gewogenen Schälchen auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen verdunstet und unter Zusatz von einigen Tropfen Alkohol zur Kristallisation stehen gelassen.

Ganz ähnlich verfahren auch andere Untersucher bei der Isolierung; eine kleine Abänderung, die vielleicht eine kleine Abkürzung der Arbeit bedeutet, hat *Lockemann* [1]) getroffen. Er verfährt bis zum Verdunsten des die Milchsäure enthaltenden Äthers genau wie *Saito* und *Katsuyama*. Dann aber ist sein Verfahren folgendes:

Der beim Abdestillieren des Äthers bleibende Rückstand wird mit H_2O aufgenommen und diese Lösung mit $PbCO_3$ (das frei von löslichen Bleisalzen sein soll) einige Zeit erwärmt. Man läßt abkühlen, filtriert, entbleit [2]) das Filtrat mit H_2S, entfernt aus dem neuen Filtrat vom PbS den H_2S durch Erwärmen der Lösung auf dem Wasserbad und entfärbt das Filtrat, falls es noch gefärbt sein sollte, mit Tierkohle. Dann kocht man die Lösung längere Zeit mit $ZnCO_3$, filtriert heiß und läßt das Filtrat im Vakuum über H_2SO_4 verdunsten, wobei das Zinklaktat in Kristallen sich ausscheidet.

Äthylalkohol.

Äthylalkohol haben *Jolly* und *Food* in normalem Blut nachweisen können. *Jolly* [3]) wendet zum Nachweis folgendes Verfahren an:

500 *g* Rinderblut werden mit dem doppelten Gewicht einer gesättigten Na_2SO_4-Lösung versetzt, das Ganze gut gemischt und sofort einer langsamen Destillation unterworfen. Man läßt etwa 50 cm^3 übergehen und prüft in diesem Destillat auf Alkohol durch vorsichtigen Zusatz einer verdünnten Chromsäurelösung, die gestattet, Alkohol noch in einer Verdünnung von 1 : 5000 nachzuweisen.

Ein Teil des Destillats dient zur Herstellung von Jodoform und schließlich verwendet man eine Probe zur Herstellung des nach Ananas duftenden Äthylbutyrats.

Food [4]) läßt das Blut ohne Zusatz und sucht durch wiederholte Fraktionierung möglichst reinen Alkohol zu erhalten. Er erhitzt Blut so

[1]) *Lockemann*, Nachweis von Fleischmilchsäure im Blut, Urin und Zerebrospinalflüssigkeit eklamptischer Frauen. Deutsche med. Wochenschr. **53**. 299 (1906).

[2]) In manchen Fällen soll nach Angaben von *Lockemann* mit H_2S kein Niederschlag entstehen. Die Untersuchung muß aber trotzdem in der angegebenen Weise weitergeführt werden.

[3]) *Jolly*, Sur l'oxydation du glucose dans le sang. Compt. Rend. **137**. 771/72 (1903).

[4]) *W. Hutson Food*, Note on the presence of alcohol in normal blood and tissues and its relation to calorifaction. Journ. of Physiol. **34**. 430/43 (1906).

rasch als möglich auf 100° und destilliert dann aus einem Kochsalzbad so lange, bis eine genügend scheinende Menge übergegangen ist. Dieses erste Destillat wird durch mehrmaliges — bis zu 12 Mal — Fraktionieren gereinigt, bis man schließlich 1—3 cm^3 eines neutralen farblosen Destillats erhält, das durch seine Brennbarkeit, sein Verhalten gegen verdünnte Chromsäurelösung, durch die Bildung von Jodoform- und Äthylbutyrat als Äthylalkohol sich charakterisiert.

Glyzerin.

Neben freiem Äthylalkohol findet sich auch der biologisch wichtigste dreiwertige Alkohol, das Glyzerin, in freiem Zustande im Blut.

Die Bestimmung geschieht am besten nach dem *Zeisel*schen Jodidverfahren[1]) unter Einhaltung der zur Vorbereitung des Blutes für diesen Zweck von *Tangl* und *Weiser*[2]) angegebenen Vorschriften:

1 *kg* Blut (ganz ebenso gestaltet sich natürlich das Verfahren auch bei Verwendung von Plasma oder Serum) wird in 2—3 *l* 96⁰/₀igen Alkohols unter beständigem Umschütteln aufgefangen. Zur Ermittlung des Gewichtes des angewandten Blutes ist die Flasche mit Alkohol vorher und nachher zu wägen. Nach etwa 24stündigem Stehen wird der Niederschlag abgesaugt, in einer Schale mit Alkohol zerrieben und nochmals auf das Filter gebracht. Diese Prozedur wiederholt man zweimal und preßt den Niederschlag in einer Buchnerpresse (300 Atmosphären) aus. Aus den vereinigten Filtraten wird der Alkohol abdestilliert; schäumt die im Kolben bleibende Flüssigkeit zu stark, so geschieht das Eindampfen in Porzellanschalen auf dem Wasserbad, bis die letzten Spuren des Alkohols verschwunden sind, was in 5 bis 6 Stunden der Fall ist. Besondere Vorsicht ist darauf zu verwenden, daß keine Eindampfungsringe an der Wand der Schale sich bilden, weil sonst Glyzerinverluste unvermeidlich sind. Man verhütet ihre Bildung dadurch, daß man jede halbe Stunde mit Wasser die Schalenränder nachspült. Die zurückbleibende, schmutzig-grünlichgelbe Flüssigkeit versetzt man nach dem Ansäuern mit Essigsäure mit Phosphorwolframsäure, solange noch ein Niederschlag entsteht[3]) (Essigsäure verwendet man statt H_2SO_4, um die Zahl der Substanzen, die man entfernen muß, nicht noch zu erhöhen). Der Niederschlag wird mit Hilfe der Zentrifuge entfernt und mit schwach essigsaurem Wasser wiederholt gewaschen. Filtrat und Waschflüssigkeit wird zur Entfernung von Fett, Phosphatiden, Cholesterin mit unter 60° siedendem Petroläther ausgeschüttelt, bis eine Probe beim Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterläßt. Die jetzt vollständig von Eiweiß, Fett, Lezithin und Cholesterin befreite wässerige Flüssigkeit wird auf dem

[1]) *S. Zeisel* und *R. Fanto*, Über ein neues Verfahren zur Bestimmung des Glyzerins. Zeitschr. f. d. landwirtschaftliche Versuchswesen in Österreich. Bd. 5. 729 (1902).

[2]) *Fr. Tangl* und *St. Weiser*, Über den Glyzeringehalt des Blutes nach Untersuchungen mit dem *Zeisel*schen Jodidverfahren. *Pflügers* Archiv. **115**. 152 (1906).

[3]) Zur Entfernung von Eiweiß.

Wasserbad eingeengt, mit überschüssiger konzentrierter Barytlösung (um Sulfate, Phosphate und Phosphorwolframsäure zu entfernen) versetzt und der Barytüberschuß durch CO_2 entfernt. Das Filtrat vom $BaCO_3$ wird mitsamt den Waschwässern auf dem Wasserbad bis auf etwa 150 *cm*³ eingeengt. Auch hier dürfen sich keine Eindampfungsringe bilden. Zur Entfernung von Chloriden läßt man die eingeengte Lösung in die 4- bis 5fache Menge 96⁰/₀igen Alkohols einfließen, wäscht den Niederschlag mit absolutem Alkohol und engt Filtrat und Waschalkohol ein. Zur Entfernung der letzten Reste von Chloriden behandelt man die Lösung mit frisch gefälltem Ag_2O und engt das Filtrat vom AgCl-Niederschlag, den man mit 96⁰/₀igem Alkohol wäscht, unter allmählichem Zusatz von Wasser — um sicher allen Alkohol zu entfernen — auf etwas weniger als 50 *cm*³ ein. Man bringt die gelbliche Flüssigkeit in ein Meßkölbchen zu 50 *cm*³, füllt mit Wasser zur Marke auf und unterwirft 20 *cm*³ — bei Anwendung von 1 *kg* Blut 400 *g* Blut entsprechend — dem Jodidverfahren. Diese 20 *cm*³ engt man in dem Siedekölbchen des Jodidapparates in einem starken Luftstrom, den man durch das Kölbchen oberhalb der Flüssigkeit streichen läßt, auf einem schwach geheizten Wasserbad auf die vorgeschriebenen 5 *cm*³ ein. Wegen der Ausführung der Bestimmung sei auf die in Band 2 dieses Handbuches auf Seite 216/18 von *Röhmann* gegebene Darstellung verwiesen.

Azeton.

Der Nachweis und die Bestimmung von Azeton im Blut kann in folgender Weise ausgeführt werden.[1])

100 *cm*³ Blut verdünnt man mit der 4—5fachen Menge einer 1- bis 2⁰/₀igen Lösung von primärem Kaliumphosphat; von diesem Gemisch werden unter guter Kühlung etwa 100 *cm*³ abdestilliert; das Destillat wird mit H_2SO_4 angesäuert und nochmals der Destillation unterworfen, wobei man wieder etwa ¹/₄—¹/₅ überdestillieren läßt. In diesem neuen Destillat, das man natürlich auch zur Anstellung der Azetonreaktionen verwenden kann, bestimmt man das Azeton nach *Messinger-Huppert*.[2])

Statt das Blut zu verdünnen und das Azeton abdestillieren, ohne die Eiweißkörper zu entfernen, ist es manchmal zweckmäßig, das Blut zu enteiweißen. *Embden* und *Kalberlah* verwenden das Verfahren von *Schenk*[3]) für diesen Zweck und destillieren dann 400—500 *cm*³ des eiweißfreien Filtrats.

Will man in normalem Blut Azeton in der Form von Dibenzalazeton nachweisen, so werden mindestens 500 *cm*³ Blut — noch besser aber wesentlich größere Quantitäten einem der oben skizzierten Verfahren unter-

[1]) *G. Embden* und *F. Kalberlah*, Über Azetonbildung in der Leber. *Hofmeisters* Beiträge. 8. 122 (1906).

[2]) Über die Ausführung dieser Bestimmung siehe dieses Handbuch. Bd. 3. S. 912 (1910).

[3]) Siehe dieses Handbuch. Bd. 2. S. 184 (1910).

worfen; durch wiederholtes Destillieren sucht man ein möglichst azetonreiches Destillat zu erhalten und fängt das letzte Destillat schließlich in Reagenzgläsern zu je 15—20 *cm*³ auf. Der Inhalt jeden Glases wird mit 2 *cm*³ 10⁰/₀iger Natronlauge und 2 Tropfen Benzaldehyd versetzt, die Flüssigkeit zur Lösung des Benzaldehyds umgeschüttelt und der Inhalt der gut zu verschließenden Gläser bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Im Verlauf mehrerer Tage geht die anfängliche Trübung in einen Niederschlag über; man saugt ihn ab, wäscht ihn alkalifrei und löst ihn in wenig heißem Alkohol; dieser Lösung fügt man bis zur beginnenden Trübung Wasser zu und läßt sie langsam abkühlen. Der Schmelzpunkt des Kondensationsproduktes ist schon nach einmaligem Umkristallisieren — sicher aber nach zweimaligem — der richtige, nämlich 112⁰.

Hat man die Aufgabe, im Blut vorgebildetes Azeton neben Gesamtazeton (vorgebildetes + Azeton aus Azetessigsäure) zu bestimmen, so führt folgendes Verfahren von *Embden* und *Engel*[1]) ziemlich rasch und sicher zum Ziel.

In 500 *cm*³ des nach der Methode von *Schenk*[2]) gewonnenen Blutfiltrats bestimmt man in der oben angegebenen Weise das Gesamtazeton nach *Messinger-Huppert.*

Eine ebenfalls 500 *cm*³ betragende Filtratmenge wird genau neutralisiert. Durch eine Vakuumdestillation, deren Geschwindigkeit man so reguliert, daß in 50—60 Minuten etwa 100 *cm*³ Destillat übergehen, entfernt man das vorgebildete Azeton und bestimmt es in bekannter Weise. Nach Beendigung der Vakuumdestillation säuert man die im Destillationskolben zurückgebliebene Flüssigkeit an und destilliert das „Azeton aus Azetessigsäure" bei Atmosphärendruck ab.

Während die vorerwähnten Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung des Azetons im Blut, die Verarbeitung recht erheblicher Blutmengen nötig machen, genügen bei der von *Oppenheimer*[3]) angegebenen Methode, die auf Versuchen von *Denigès*[4]) beruht, ganz kleine Blutmengen (etwa 3—5 *cm*³).

Das Prinzip der Methode ist folgendes: Azeton gibt beim Erhitzen mit saurem Quecksilbersulfat einen in H_2O unlöslichen Niederschlag von der Zusammensetzung: $(2\,HgSO_4\ 3\,HgO)_3 \,.\, 4\,CO(CH_3)_2$ (?).

[1]) *G. Embden* und *H. Engel*, Über Azetessigsäurebildung in der Leber. *Hofmeisters* Beitr. **11**. 323 (1908).

[2]) *Fr. Schenk*, Über Bestimmung und Umsetzung des Blutzuckers. *Pflügers* Arch. 55. 203/11 (1894). Das Verfahren besteht darin, daß man Blut (Serum) auf das Doppelte verdünnt, dieser Lösung auf 1 Volumen Blut erst 2 Volumina 2⁰/₀iger Salzsäure, dann 2 Volumina 5⁰/₀iges Sublimat zufügt. Also kommen auf 100 *cm*³ Blut (Serum) erst 100 Wasser, dann 200 *cm*³ Salzsäure und 200 *cm*³ Sublimatlösung.

[3]) *C. Oppenheimer*, Über einen bequemen Nachweis von Azeton in Harn und anderen Körperflüssigkeiten. Berliner klin. Wochenschr. **36**. 828/29 (1899).

[4]) *Denigès*, Sur les fonctions organiques pouvant se combiner au sulfate mercurique. Compt. Rend. **126**. 1868 (1898). — Idem. Combinaison, recherche et dosage de l'acétone ordinaire avec le sulfate mercurique. Compt. Rend. **127**. 963 (1898).

Man versetzt etwa 3 *cm*³ Blut mit so viel Reagens, bis kein Niederschlag mehr entsteht. (Das Reagens stellt man sich her, indem man 50 *g* Quecksilberoxyd (via humid. parat.) in einer Lösung von 200 *cm*³ konzentrierter H_2SO_4 und 100 *cm*³ Wasser löst.) Man braucht zu dem angegebenen Zweck etwa das 10fache Volumen Reagens. Das Blut gerinnt zu einer tiefbraunen Masse; man läßt den Niederschlag sich absetzen und prüft, ob die überstehende Flüssigkeit auf Zusatz von noch mehr Reagens nicht noch einen Niederschlag gibt. Wenn nicht, dann setzt man noch etwa 2—3 *cm*³ Reagens zu, filtriert, fügt noch etwas Schwefelsäure zu (die Lösung muß stark sauer sein) und erwärmt. Ein weißer Niederschlag, der in einem Überschuß von HCl sich löst, zeigt Azeton (bzw. Azetessigsäure) an.

Zur quantitativen Bestimmung fällt man das Blut erst mit dem Reagens, überzeugt sich in einer anderen qualitativen Probe, ob viel oder wenig Azeton vorhanden ist und fügt dann je nach Umständen einen Überschuß von 25—30 *cm*³ Reagens zu, nachdem man aber zuerst den Eiweißniederschlag abfiltriert hat. Man bringt die Lösung in ein Stöpselglas (gut eingeschliffener Stopfen!), verschnürt und erhitzt die Flasche eine halbe Stunde im Wasserbad. Nach dem Abkühlen sammelt man den Niederschlag auf einem Gooch-Tiegel, wäscht ihn erst mit Wasser säurefrei, schließlich dann noch mit Alkohol und Äther und wägt nach dem Trocknen. Das Gewicht des Niederschlages wird zur Berechnung der Azetonmenge mit 0·055 multipliziert. Der Faktor 0·055 entspricht einer Formel: $5\,HgSO_4 \,.\, 7\,HgO \,.\, 3\,CO(CH_3)_2$.

Oxybuttersäure.

Außer Azeton und Azetessigsäure kann — vor allem bei Diabetikern — auch noch der 3. Azetonkörper, die β-Oxybuttersäure, manchmal im Blut sich finden.

Zu ihrem Nachweis hat *Geelmuyden* folgenden Weg eingeschlagen.[1])

100—200 *cm*³ Blut werden mit 600 *cm*³ Wasser verdünnt; hierzu gibt man 12 *g* KOH in Substanz, digeriert erst 24 Stunden bei Zimmertemperatur und dann auf kochendem Wasserbad bis zur Lösung des Niederschlages. Nach dem Erkalten säuert man mit verdünnter H_2SO_4 an (100 *cm*³ genügen in der Regel; die Säure enthält in 1000 *cm*³ 70 *cm*³ konzentrierter H_2SO_4), füllt auf 1000 *cm*³ mit Wasser auf und filtriert in einem 2 *l* fassenden Meßkolben. Zum Filtrat gibt man ½ Volumen einer 10%igen Phosphorwolframsäurelösung (100 *g* Phosphorwolframsäure + 100 *cm*³ konzentrierte H_2SO_4 auf 1000 *cm*³ gebracht), filtriert den voluminösen Niederschlag ab, mißt das Filtrat genau, versetzt mit NH_3 bis zu alkalischer Reaktion, dampft ein und bestimmt in dieser Lösung die β-Oxybuttersäure nach *Magnus-Levy*.[2])

[1]) *H. Chr. Geelmuyden*, Über den Azetonkörpergehalt der Organe an Coma diabeticum Verstorbener. Zeitschr. f. physiol. Chem. 58. 256 (1908/09).

[2]) Die Methode ist ausführlich in diesem Handbuch beschrieben. Bd. 3. S. 929 (1910).

Indoxyl, Indol und Skatol.

In ganz geringer Menge finden sich im Serum schließlich noch Indoxyl, Indol und Skatol, zu deren Nachweis *Hervieux* folgende Verfahren ausgearbeitet hat.

Zum Indoxylnachweis[1]) wird Serum, mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt, durch Erwärmen auf dem Wasserbad unter Zusatz von basischem Bleiazetat enteiweißt; entsteht auf Zusatz von basischem Bleiazetat kein Niederschlag mehr, dann entfernt man den Niederschlag, wäscht ihn aus und fällt aus dem Filtrat den Bleiüberschuß mit Hilfe einer konzentrierten Na_2SO_4-Lösung; man filtriert von neuem, macht das Filtrat mit Soda schwach alkalisch und engt es auf dem Wasserbad auf etwa 20 cm^3 ein. Die anfänglich farblose Flüssigkeit dunkelt mehr und mehr nach. Man fügt ihr ein gleiches Volum Isatinchlorhydratlösung (0·05 *g* Chlorhydrat im Liter) zu und bringt dann 7 Minuten auf das kochende Wasserbad. Man kühlt ab und schüttelt die Lösung mit $CHCl_3$ aus, das hierbei eine leicht gelbliche Farbe annimmt. Wäscht man das $CHCl_3$ mehrmals mit verdünnter Kalilauge (2:1000), so wird die Lösung in $CHCl_3$ rosafarben. Verdunstet man den Hauptteil des Lösungsmittels, so wird die Probe sehr deutlich. Dampft man die Lösung schließlich im Platintiegel zur Trockene ein und erhitzt man den Rückstand vorsichtig, so verflüchtigt sich die Substanz unter Bildung violetter Dämpfe von Indirubin. Die Menge Indoxyl, die im Blut sich findet, ist außerordentlich klein.

Zum Nachweis von Indol und Skatol[2]) wird das Serum mit dem gleichen Volum Wasser verdünnt und wiederholt mit Benzol ausgeschüttelt. Die hierbei sich bildende Emulsion bringt man auf ein mit Wasser angefeuchtetes Filter; das Wasser und eventuell noch vorhandene Blutkörperchen gehen durchs Filter; die Emulsion bleibt oben. Hat sich die Emulsion getrennt, so hebt man das Benzol ab und weist das Indol und Skatol mit Hilfe der p-Dimethylaminobenzaldehydreaktion[3]) nach.

Man bringt zu diesem Zweck 10 cm^3 der verdünnten Benzollösung von Indol und Skatol in eine Reagierröhre, fügt 2 cm^3 einer alkoholischen Dimethylaminobenzaldehydlösung (1 *g* in 25 cm^3 90%igen Alkohol) zu, schüttelt um und bringt mit Hilfe einer sehr fein ausgezogenen Pipette einige Kubikzentimeter Salzsäure auf den Boden der Flüssigkeit, ist Indol und Skatol vorhanden, so bildet sich an der Berührungsstelle eine karminrote Scheibe.

5. Anorganische Salze.

Verascht man Blut (Plasma oder Serum), so erhält man die Summe aller vorher in der Lösung vorhandenen anorganischen Bestandteile in der Asche.

[1]) *C. Hervieux,* Recherches de l'indoxyle dans le sang. Compt. Rend. de la Soc. de Biol. **56**. 622 (1904).

[2]) *Hervieux,* Recherches sur la présence de l'indol et du scatol dans le sang. Compt. Rend. de la Soc. de Biol. **56**. 623/25 (1904).

[3]) *E. Fischer,* Über das Methylketol. Annalen d. Chem. **242**, 372 (1887).

Da bei der Verbrennung von Eiweiß Schwefelsäure und Phosphorsäure gebildet werden, so ist zum mindesten ein Teil dieser Substanzen, möglicherweise aber auch noch andere Aschenbestandteile (Alkalien), auf diese Quelle zurückzuführen. Weiter muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß die neu gebildete H_2SO_4 und H_3PO_4 Salzsäure und Kohlensäure verdrängt haben könnten. Es ist darum ohne weiteres klar, daß die Veraschung uns kein klares Bild von der Art und der Menge der anorganischen Salze, die vorgebildet im Serum sich finden, geben kann.

Eine direkte Bestimmungsmethode einzelner anorganischer Bestandteile im Blut oder Serum ist, so viel ich sehe, kaum je angegeben worden. Nur über die Bestimmung von ClNa, das nach *Bugarszky* und *Tangl*[1]) den Hauptbestandteil der anorganischen Bestandteile des Serums bildet, macht *v. Hösslin*[2]) folgende Angaben:

Die Bestimmung des ClNa wird mit 5 *cm*³ Serum vorgenommen, das verdünnt und mit HNO_3 versetzt, stets ziemlich klar durchs Filter geht. Kontrollversuche bei Veraschung bzw. Enteiweißung und nachfolgender Bestimmung ergaben höchstens einen Unterschied von 0·00587 bis 0·01174 *g* NaCl auf 100 *cm*³ Serum. Angaben über die zur Chlorbestimmung angewandte Methode fehlen.

Die bei direkter Veraschung unvermeidlichen Unsicherheiten über die Deutung der erhaltenen Resultate vermindern sich, ohne sich übrigens ganz ausschalten zu lassen, bei Einhaltung folgenden Verfahrens[3]):

Man fällt das Blut (Serum oder Plasma) mit der mehrfachen (mindestens 5fachen) Menge 96%igen Alkohols, filtriert durch ein aschefreies Filter und wäscht den Niederschlag erst mit heißem Alkohol, dann mit Wasser (heiß) aus.

Den alkoholischen Auszug verdunstet man bei mäßiger Wärme (nicht über 60°), zieht den Rückstand mit absolutem Alkohol aus, verdunstet diese Lösung wieder und zieht den neuen Rückstand mit vollkommen trockenem, alkoholfreiem Äther aus; dieser Äther nimmt die Phosphatide auf; die in absolutem Alkohol und in Äther unlöslichen Rückstände löst man in Wasser und vereinigt diese Lösung mit dem wässerigen Auszug. Die wässerige Lösung wird ebenfalls eingedunstet, der Rückstand getrocknet, verascht und die Asche nach bekannten Regeln der qualitativen Analyse untersucht oder zur quantitativen Bestimmung einzelner Bestandteile verwendet.

Der bei der Fällung des Blutes mit Alkohol entstehende Niederschlag wird, nachdem man ihn, wie oben angegeben, gewaschen hat, getrocknet

---

¹) *St. Bugarszky* und *F. Tangl*, Physikalisch-chemische Untersuchungen über die molekularen Konzentrationsverhältnisse des Blutserums. *Pflügers* Archiv. 72. 531 (1898).

²) *v. Hösslin*, Beitrag zur Frage der chemischen Veränderung des Blutes nach Aderlässen. *Hofmeisters* Beitr. 8. 431/38 (1906).

³) Siehe *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handb. d. phys. u. path.-chem. Analyse. 8. Aufl. Berlin, Hirschwald, 1909. S. 645.

und für sich verascht. Er enthält die Phosphate der alkalischen Erden neben Proteinen. Die Asche wird mit Salzsäure ausgezogen und dann die Lösung in bekannter Weise weiterverarbeitet.

V. Untersuchung der Formelemente auf einzelne Bestandteile.

Die Methoden, die für den in der Überschrift angegebenen Zweck Verwendung finden, sind in der Hauptsache die gleichen wie bei der Untersuchung von Blut, Plasma oder Serum. Dieser Umstand sowie die weiteren, daß die Zahl der in den Formelementen nachgewiesenen Bestandteile wesentlich kleiner ist als im Serum, und daß die Formelemente weniger oft Gegenstand einer eingehenden chemischen Untersuchung gewesen sind, lassen es verständlich erscheinen, daß die Zahl der speziell für die Untersuchung der Formelemente ausgearbeiteten Methoden eine recht beschränkte ist.

Von den 3 verschiedenen Arten geformter Elemente hat man die Blutplättchen und die Leukozyten bis jetzt nicht in Mengen gewinnen können, die für eine eingehende chemische Untersuchung ausgereicht hätten. Über die Zusammensetzung und die Bestandteile der Blutplättchen weiß man deshalb so gut wie nichts; das wenige, was man über die Bestandteile der Leukozyten weiß, ist festgestellt worden bei der Untersuchung von Eiterkörperchen.[1])

Ich darf daher diese beiden Arten von geformten Elementen füglich übergehen und werde mich auf die Beschreibung einiger Methoden zur Untersuchung der Erythrozyten beschränken.

1. Eiweißstoffe.

Unter den Eiweißstoffen der Erythrozyten nimmt der Blutfarbstoff sowohl seiner Menge als auch seiner biologischen Bedeutung nach die erste Stelle ein.

Auf diesen Bestandteil näher einzugehen, muß ich mir versagen, weil in diesem Handbuch sowohl seine Darstellung[2]) als auch seine quantitative Bestimmung[3]) schon eingehend beschrieben worden sind. Außerdem ist

[1]) Die Isolierung des nach *Huppert* in den Leukozyten des Blutes sich findenden Glykogens ist bei den Methoden zur Untersuchung der Erythrozyten an geeigneter Stelle beschrieben.

[2]) *Fr. N. Schulz*, Darstellung von Blutfarbstoffkristallen. Dieses Handbuch. Bd. 2. S. 339 (1910).

[3]) *Franz Müller*, Die Blutkörperchenzählung und Hämoglobinbestimmung. Bd. 3. S. 707/41 (1910).

Bezüglich der auf S. 741 sich findenden, recht absprechenden Beurteilung des *Hüfner*schen Spektrophotometers verweise ich auf meine Notiz: Zur Spektrophotometrie des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 63. 313/14 (1909).

Ich habe dort hervorgehoben, daß in der unter meiner Leitung ausgeführten Arbeit von *E. E. Butterfield*, Über die Lichtextinktion des Blutfarbstoffs [Zeitschr. für physiol. Chemie. 62. 173 (1909)] alle spektrophotometrischen Resultate mit Hilfe des *Hüfner*schen Spektrophotometers gewonnen worden sind, und ich kann heute, auf Grund weiterer $1^1/_2$jähriger Erfahrung den Schlußsatz jener Notiz über die Brauchbarkeit des Instruments in geübten Händen nur vollauf bestätigen.

erst vor kurzem an anderer Stelle[1]) eine eingehende Darstellung der Gewinnung, qualitativen und quantitativen Bestimmung des Hämoglobins erschienen.

Immerhin aber mögen hier einige Worte über die Gewinnung von Hämoglobinkristallen nach der Alkoholmethode aus Pferde- und Rinderblut auf Grund von Erfahrungen, mit deren weiterer Ausarbeitung ich noch beschäftigt bin, Platz finden.

Blutkörperchen, die man entweder durch freiwilliges Sedimentieren (Pferdeblut) oder durch Ausschleudern mit Hilfe der Zentrifuge isoliert hat, wäscht man wiederholt (mindestens 2mal) mit 0·9%iger NaCl-Lösung auf der Zentrifuge.

Den Blutkörperchenbrei versetzt man dann mit etwa dem gleichen Volumen ausgekochten Wassers von etwa 40°, bringt die Mischung zweckmäßig ebenfalls auf 35—40° und trennt die Lösung von den ungelösten Körperchen, deren Menge nicht mehr allzu groß ist, und dem Stroma mit Hilfe der Zentrifuge. Die abgehobene Lösung kühlt man dann auf 0° ab und versetzt sie mit ebenfalls gekühltem absolutem Alkohol, den man unter beständigem Umschütteln der Lösung in dünnem Strahl zufließen läßt (andernfalls bilden sich leicht amorphe Gerinnsel). Bei Pferdeblut verwende ich auf 5 Volumen Blutlösung ein Volumen Alkohol, bei Rinderblut auf 3—4 Volumen ein Volumen. Man bringt die Mischung bei Pferdeblut in Eis, bei Rinderblut am besten in eine Kältemischung (Eis und Kochsalz). Bei Anwendung von Pferdeblut ist nach 12 Stunden in der Regel die ganze Mischung zu einem Kristallbrei erstarrt, bei Rinderblut ist mindestens 24stündiges Stehen notwendig. Die Kristalle trennt man von der Mutterlauge am leichtesten und raschesten mit Hilfe der Zentrifuge, wobei es sich empfiehlt, die Gläser vor dem Einfüllen des Kristallbreies abzukühlen.

Zum Umkristallisieren dieser ersten, mit Hilfe von Alkohol erhaltenen Kristalle verfahre ich in folgender Weise: Die gut ausgeschleuderten Kristalle übergießt man mit soviel ausgekochtem Wasser von etwa 40°, daß ein Teil der Kristalle auch beim Erwärmen der Mischung auf 30 bis 35° noch ungelöst bleibt. Man trennt mit Hilfe der Zentrifuge Gelöstes und Ungelöstes und stellt die Lösung in schmelzendes Eis. Nach wenigen Stunden (3—4) beginnt beim Pferdeblut die Kristallisation und nach 12 Stunden haben sich meist große Mengen von Kristallen ausgeschieden. Bei Rinderblut ist langes Stehen erforderlich. Dieser Umstand bringt es mit sich, daß die Kristalle aus Rinderblut meist methämoglobinhaltig sind, während in dem auch noch ein 3. Mal umkristallisierten Pferdehämoglobin spektrophotometrisch nachweisbare Quantitäten von Met-Hb sich nicht finden.

Neben Hämoglobin findet sich nach *Wooldridge*[2]) Paraglobulin, das man am besten aus dem Stroma, nach dem oben[3]) beschriebenen

[1]) *K. Bürker*, Gewinnung, qualitative und quantitative Bestimmung des Hämoglobins. *Tigerstedt*, Handbuch der physiolog. Methodik. Leipzig bei Hirzel (1910).

[2]) *B. Wooldridge*, Zur Kenntnis der Blutkörperchen. Arch. f. Anat. u. Phys. 1881. (Physiol. Abteilung) S. 389.

[3]) Siehe S. 146.

Verfahren gewonnen, isoliert, indem man das Stroma mit mehrprozentiger (etwa 5%) NaCl-Lösung schüttelt, wobei Paraglobulin in Lösung geht. Durch Sättigen der Lösung mit Kochsalz fällt das Paraglobulin aus und kann eventuell durch Lösen und Wiederausfällen gereinigt werden.

In den Kernen der Vogelblutkörperchen findet sich Histon. Die Isolierung der Kerne sowohl, als auch die Darstellung des Histons findet sich an früherer Stelle[1]) schon beschrieben.

Zur quantitativen Bestimmung des Gesamteiweißes in den Blutkörperchen sind die gebräuchlichsten Methoden folgende beiden:

Man trägt die gewogene Blutkörperchenmasse quantitativ (mit Hilfe von etwas Wasser) in die 4—5fache Menge kochenden Wassers; dann fügt man tropfenweise Essigsäure zu der kochenden Lösung, bis der Niederschlag gut ausflockt und die Lösung vollkommen klar ist. Man filtriert auf ein gewogenes aschefreies Filter, wäscht erst mit Wasser, dann mit Alkohol und schließlich mit Äther, trocknet den Rückstand bei 110°, wägt, verascht und zieht die Asche von dem zuerst ermittelten Gewicht ab.

Der 2. Weg besteht darin, daß man den Blutkörperchenbrei erst mit wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure versetzt und dann das 4—5fache Volum Alkohol zugibt. Man läßt dann einige Stunden stehen, besser ist es, noch einige Zeit auf dem Wasserbad zu kochen, wobei man den verdunstenden Alkohol ersetzt, filtriert den Niederschlag ab, wäscht ihn erst mit Alkohol, dann mit Wasser, wieder mit Alkohol und zum Schluß mit Äther, trocknet und wägt. Das erste alkoholisch-wässerige Filtrat dampft man zur Trockene ein, zieht den Rückstand erst mit Alkohol, dann mit Äther aus und bringt das Ungelöste auf ein gewogenes Filter; man wäscht gut aus, trocknet und wägt und verascht mit dem zuerst erhaltenen Niederschlag. Dieses Verfahren ist unbedingt notwendig, weil der ersten Fällung mit Alkohol meist geringe Eiweißmengen entgehen.

2. Fett und fettartige Bestandteile.

Nach den Untersuchungen von *Abderhalden*[2]) finden sich echtes Fett und Fettsäuren (bzw. natürlich fettsaure Alkalien) in den Blutkörperchen nicht. Dagegen findet sich Lezithin, das man nach *Wooldridge*[3]) in folgender Weise aus dem Stroma isolieren kann:

Isolierung von Lezithin.

Man zieht das frische Stroma bei etwa 45° mit 80—90%igem Alkohol aus. Beim Erkalten fällt Cholesterin aus; das Filtrat von dieser Aus-

[1]) *H. Steudel*, Histone und Protamine. Dieses Handbuch. Bd. 2. 442/43 (1910).

[2]) *E. Abderhalden*, Zur vergleichenden quantitativen Analyse des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 25. 65 (1898).

[3]) *L. Wooldridge*, Zur Chemie der Blutkörperchen. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1881. (Physiol. Abt.) 389.

scheidung wird bei 40—45° eingedampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen. Dabei bleibt etwas Hämatin ungelöst. Versetzt man diese Lösung mit einer Lösung von Platinchlorid in absolutem Alkohol, der man zuvor ein paar Tropfen konzentrierter HCl zugefügt hat, so erhält man einen kristallinischen gelblichweißen Niederschlag, der sich in Chloroform bis auf einen kleinen Rest löst. Der beim Verdunsten des Chloroforms bleibende Rückstand gibt bei der Analyse auf eine Formel $(C_{42}H_{82}NPO_8)_2H_2PtCl_6$, die von *Strecker* aufgestellt wurde[1]), stimmende Zahlen.

Cholesterinisolierung.

Cholesterin hat ebenfalls *Wooldridge*[2]) aus dem Stroma gewonnen, und zwar dadurch, daß er das Stroma wiederholt mit kaltem Petroläther auszog, der beim Verdunsten Cholesterin frei von Fett und phosphorhaltigen Beimengungen hinterließ.

Direkt aus den Blutkörperchen erhielt *Hepner*[3]) Cholesterin nach folgendem Verfahren, das er auch zur annähernden quantitativen Bestimmung benutzte.

Blutkörperchen werden aus Oxalatblut durch Zentrifugieren gewonnen, mit etwa dem 6fachen Volumen 3½%iger NaCl-Lösung durchgerührt und wieder zentrifugiert. (Ein anderer Weg ist der, daß man Blut gerinnen läßt und den Blutkuchen nach 24stündigem Stehen durch Mull preßt, um das Fibrin abzutrennen, und die durchgepreßte Masse dann zentrifugiert.)

Für quantitative Zwecke trocknet man eine kleine Probe der Blutkörperchen bei 110—115°, um durch Vergleich des Gewichtes der feuchten und trockenen Probe den Trockensubstanzgehalt der untersuchten Blutkörperchenmasse zu erfahren. Die gewogene Hauptmenge der Blutkörperchen wird mit dem 4fachen Volum Alkohol verrührt und die Mischung 48 Stunden in den Wärmeschrank gestellt; nach dieser Zeit saugt man den Niederschlag ab, zerreibt ihn mit ⅔ der ursprünglich angewandten Alkoholmenge und bringt die Masse wieder auf einige Zeit in den Wärmeschrank. Schließlich erhitzt man die Mischung zum deutlichen Kochen auf dem Wasserbad, saugt den Niederschlag ab und zerreibt ihn nochmals mit Alkohol. Die alkoholischen Auszüge werden eingeengt und die letzten Reste Alkohol durch Abdampfen nach Zusatz von Wasser verjagt. Die wasserige Flüssigkeit bringt man zusammen mit etwaigen festen Ausscheidungen mit Hilfe von Äther in einen Scheidetrichter und schüttelt sie wiederholt mit Äther aus (mindestens 5mal je etwa 10 Minuten lang). Der Äther

[1]) Es würde also ein Palmitinsäure und Ölsäure enthaltendes Lezithin vorliegen, wobei zu beachten bleibt, daß die Analyse allein keine bestimmten Schlüsse auf das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Säuren zuläßt.

[2]) *L. Wooldridge*, Zur Chemie der Blutkörperchen. Arch. f. Anat. u. Phys. 1881 (Phys. Abteil.) 389.

[3]) *E. Hepner*, Über den Cholesteringehalt der Blutkörperchen. *Pflügers* Archiv. 73. 595/606 (1898).

wird abdestilliert; den Rückstand, der beim Verdunsten des Äthers bleibt, kocht man mit Essigäther aus, läßt abkühlen und filtriert die Essigätherlösung vom Ungelösten ab. Dieses letztere spült man mit kaltem Essigäther so lange nach, bis der Essigäther nichts mehr aufnimmt (Probe auf Uhrglas verdunsten lassen!). Der Essigätherextrakt wird mit Tierkohle gekocht und in einem tarierten Kolben filtriert. Nach dem Abdestillieren des Essigäthers hinterbleibt Cholesterin neben einer ganz minimalen Verunreinigung (unwägbar). Nach einmaligem Umkristallisieren zeigt das Cholesterin den richtigen Schmelzpunkt von 144—145°. An Stelle der etwas zeitraubenden Behandlung des Ätherrückstandes mit Essigäther wird es sich zweifellos empfehlen, die von *Windaus* angegebene und oben beschriebene Digitoninmethode zur Isolierung und quantitativen Bestimmung anzuwenden.

3. Kohlehydrate.

Glukose.

Daß entgegen älteren Angaben nicht bloß im Serum, sondern auch in den Formelementen Zucker sich findet, haben *Rona* und *Michaelis*[1]) gezeigt. Zur quantitativen Bestimmung[2]) des Zuckers haben sie die Blutkörperchen in folgender Weise verarbeitet:

Die Blutkörperchen werden $^3/_4$ Stunden mit 3000 Touren pro Minute abzentrifugiert, mit ClNa-Lösung wiederholt gewaschen und möglichst weitgehend zusammen zentrifugiert, mit bekannten Mengen von destilliertem Wasser in einem vorher tarierten Kolben gespült und ihre Menge durch Wägung festgestellt. Dann werden je 50 *g* Blutkörperchen auf 2000 *cm*³ mit Wasser aufgefüllt. Zu der lackfarbenen Flüssigkeit wird eine auszuprobierende Menge Eisenhydroxydlösung zugegeben, dann noch eine geringe Menge (zirka 10 *g*) eines Elektrolyten, wozu man am besten ein Sulfat wählt, weil die zweiwertigen Anionen gegen das kathodische Eisenhydroxyd viel wirksamer sind als die einwertigen. Am besten verwendet man $MgSO_4$; unangebracht ist dieses, wenn der Zucker nachher vergoren werden soll; in diesem Falle wählt man K_2SO_4, Na_2SO_4 oder $ZnSO_4$. Der Zusatz von Eisenlösung soll soweit getrieben werden, daß eine abfiltrierte Probe nur noch ganz wenig Hämoglobin enthält. Dann wird die Flüssigkeit durch mehrere sehr große Faltenfilter abfiltriert und ein großer, aliquoter Teil weiter verarbeitet. Jetzt wird die Entfernung des Hämoglobins durch nochmaligen Zusatz von kleineren Mengen Eisenlösung ohne Schwierigkeit beendet, wieder ein möglichst großer aliquoter Teil abfiltriert, das nun wasserklare, eiweißfreie Filtrat bei leicht essigsaurer Reaktion auf ein möglichst kleines Volumen eingeengt, derart, daß der zugegebene Elektrolyt gerade ganz in Lösung bleibt und polarisiert.

[1]) *P. Rona* und *L. Michaelis*, Untersuchungen über den Blutzucker. Bioch. Zeitschr. **16**. 61 (1909).

[2]) Ebenso wird man auch zum qualitativen Nachweis des Zuckers verfahren.

Beispiel: 69 *g* Blutkörperchen werden auf ein Volumen von 3390 cm^3 gebracht, inbegriffen 10 *g* $ZnSO_4$ und 400 cm^3 Eisenlösung. Hiervon werden durch Filtration wiedergewonnen 2660 cm^3, noch eine Spur Hämoglobin enthaltend. Es werden hiezu 150 cm^3 halbverdünnte Eisenlösung zugefügt. Das nunmehr hämoglobin- und eiweißfreie Filtrat (2580 cm^3) wird auf 24 cm^3 eingeengt und polarisiert. Gefundene Drehung 0·270°. Daraus berechnet sich der Zuckergehalt pro 100 *g* Blutkörperchen zu

$$0{\cdot}270 \cdot \frac{24 \times 2810 \times 3390 \times 100}{100 \times 2580 \times 2669 \times 69}.$$

Nach den Angaben von *Lépine* und *Boulud*[1]) findet sich die Glykuronsäure nur in den Blutkörperchen (jedenfalls beim Hund). Ihr Nachweis in den Körperchen ist in genau der gleichen Weise zu führen wie *Mayer* ihn im Blut geführt hat (siehe S. 18).

Glykogen.

Glykogen soll sich nach Angaben von *Huppert* in den Leukozyten finden. Der Weg, auf dem *Huppert* dieses Polysaccharid nachweisen konnte, ist folgender[2]):

Da es wahrscheinlich ist, daß das Glykogen in den farblosen Blutkörperchen sich findet, das Fibrin aber viel Leukozyten einschließt und auch nach *Hupperts* Erfahrung das Glykogen aus festen Massen nur schwer in das Lösungsmittel übergeht, wird das Blut nur in ungeronnenem Zustande untersucht.

Das Blut[3]) wird sofort bei der Entleerung mit $^1/_{10}$ Volum (oder mehr) gesättigter Kupferazetatlösung gemischt, wobei das Blut einen mäßig dicken homogenen von Gerinnseln freien Brei bildet. Darauf wird das Blut noch mit mehr gesättigter Cu-azetat-Lösung versetzt, wenn das beim Kochen entstehende Gerinnsel nicht grobkörnig ausfallen soll. Für Kalbsblut genügt im ganzen $^1/_{10}$ Volum, für anderes Blut nimmt man zweckmäßig $^1/_4$ Volum der Azetatlösung. Die Mischung wird dann auf das $1^1/_2$—2fache verdünnt, mit NaOH bis zur schwach sauren oder neutralen Reaktion versetzt, eine Zeitlang im Sieden erhalten und durch Faltenfilter heiß filtriert; der Niederschlag wird sorgfältig vom Papier befreit, wenn nötig mittelst eines feinmaschigen Metallsiebes und in der Regel noch 2mal ausgekocht. Ein öfteres Auskochen erhöht die Ausbeute an Glykogen nur unwesentlich. Die vereinigten Filtrate werden zunächst auf freier Flamme, dann auf dem Wasserbad so weit eingeengt, daß das Natriumazetat in der Kälte eben noch in Lösung bleibt.

[1]) *Lépine* et *Boulud*, Sur l'acide glycuronique du sang. Compt. Rend. 136. 1037.

[2]) *Huppert*, Über das Vorkommen von Glykogen in Blut und Eiter. Zeitschr. f. physiol. Chem. 18. S. 151 (1894).

[3]) Von Hundeblut genügen 200 *g* zum einwandfreien Nachweis; bei Rinderblut erhält man mit 500 *g* ein zweifelhaftes, mit 1 *kg* ein völlig überzeugendes Resultat. Am besten verarbeitet man, wenn möglich, 2·5—3 *kg* auf einmal.

Zur Entfernung des Kupfers versetzt man die Lösung jetzt mit Schwefelammonium, säuert dann mit Essigsäure an und erwärmt auf dem Wasserbad, wobei das Schwefelkupfer sich meistens gut absetzt. Es wird alsdann mittelst der Saugpumpe durch ein Asbestfilter filtriert und im Filtrat der Eiweißrest in bekannter Weise durch Jodquecksilberkalium und Salzsäure gefällt; der Eiweißniederschlag wird wieder durch ein Asbestfilter, das man zuvor durch konzentrierte Salzsäure von Ferriverbindungen befreit hat[1], filtriert. Das scheinbare einfachere Verfahren, das Schwefelkupfer und den Eiweißniederschlag zusammen abzufiltrieren, empfiehlt sich nicht, weil das Filtrieren unverhältnismäßig viel Zeit in Anspruch nimmt und das Glykogen dann ebensolang mit der Salzsäure in Berührung bleibt.

Das eiweißfreie Filtrat wird wie üblich mit 2 Vol. Alkohol (96%) versetzt, der Niederschlag auf einem Asbestfilter gesammelt und mit 96%igem Alkohol gewaschen. Ist der Niederschlag noch nicht weiß, so kann er noch einmal in H_2O gelöst und durch Alkohol wieder gefällt werden. Das Glykogen ist dann schon so rein, daß man mit ihm alle gewöhnlichen Reaktionen anstellen kann.

Die Asbestfilter sind den Papierfiltern vorzuziehen, nicht bloß weil sie dichter sind, sondern auch hauptsächlich deshalb, weil sie sich leichter auswaschen lassen und das Glykogen von ihnen mit viel weniger Wasser vollkommen entfernt werden kann, als von Papierfiltern. Bei den Papierfiltern ist ferner eine Verunreinigung des Glykogens durch Stärke u. dgl. zu befürchten.

4. Extraktivsubstanzen

scheinen in den Körperchen sich nicht oder jedenfalls nur in ganz untergeordneter Menge zu finden. Nur Harnstoff ist von *Schöndorff* nachgewiesen und bestimmt worden nach einem Verfahren, daß im vorhergehenden schon beschrieben worden ist.[2] Er verfuhr dabei so, daß er das erwähnte Verfahren einmal auf Blut und einmal auf das Serum anwandte, nachdem er zuvor das Verhältnis von Serum zu Körperchen in dem angewandten Blut nach dem Verfahren von *Bleibtreu*[3] bestimmt hatte. Durch einfache Rechnung war dann der Harnstoffgehalt der Körperchen zu erfahren.

5. Anorganische Bestandteile

der Blutkörperchen werden in entsprechender Weise wie im Serum nachgewiesen und bestimmt.

---

[1] Es tritt andernfalls im Filtrat freies Jod auf, das sich mit dem Glykogen verbindet, was wohl besser vermieden wird.

[2] Siehe S. 182.

[3] Siehe S. 153.

VI. Verfahren zur Bestimmung verschiedener Blutbestandteile in einer Blutportion.

(Gesamtblutanalyse.[1])

Man wägt etwa 50 *g* Serum[2]) genau ab, gießt es in das mehrfache Volum Alkohol[3]), macht die Mischung mit verdünnter Essigsäure eben sauer und läßt einige Zeit — am besten 24—48 Stunden — stehen.

Man bringt dann auf ein gewogenes aschefreies Filter und wäscht mit kaltem Alkohol aus. (Filtrat 1 = Hauptfiltrat + Waschalkohol kalt.) Dann wäscht man nacheinander einige Male mit heißem Alkohol, dann mit Äther, schließlich nochmals mit Alkohol. Diese Waschflüssigkeiten seien als Filtrat 2 bezeichnet. Zum Schluß wäscht man den Niederschlag noch mit heißem Wasser aus, bis auch dieses nichts mehr aufnimmt (Filtrat 3).

A. Der Filterrückstand enthält die überwiegende Menge der Proteinstoffe und in Wasser unlösliche Salze. Es wird zur Entfernung des Wassers nochmals mit Alkohol gewaschen, bis zu konstantem Gewicht bei 110—120° getrocknet, gewogen und schließlich mit dem Teil der Proteinstoffe, die in das wässerig alkoholische Filtrat (1) übergegangen sind, zusammen verascht.

B. Das Filtrat 1 wird bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur auf dem Wasserbad verdunstet und der Rückstand mit dem Filtrat 2 übergossen und zerrieben. Man läßt absitzen, dekantiert auf ein kleines aschefreies gewogenes Filter und wäscht den Rückstand wiederholt mit Alkohol und Äther. Schließlich zerreibt man den in Alkohol und Äther unlöslichen Teil noch mit dem Filtrat 3 und filtriert durch das eben schon benutzte Filter, fängt dieses wässerige Filtrat aber getrennt von dem alkoholisch-ätherischen auf.

Man bringt das Ungelöste quantitativ auf das Filter und wäscht es mit Wasser aus. Der auf dem Filter bleibende Rückstand wird getrocknet, gewogen und zusammen mit dem ersten Filterrückstand verascht. Das Gewicht der beiden getrockneten Filterrückstände, vermindert um die Summe der Asche, gibt das Gewicht der in dem angewandten Serum (Blut etc.) enthaltenen Proteinstoffe.

Der wässerige Auszug (ursprünglich Filtrat 3) wird auf dem Wasserbad verdunstet (in gewogener Schale), der Rückstand bei 110° getrocknet, gewogen, verascht und die Asche wieder gewogen. Der alkoholisch-ätherische Auszug (ursprünglich Filtrat 2) enthält die Hauptmenge der Fette, Phosphatide etc. und Extraktivstoffe. Er wird bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur auf dem Wasserbad verdunstet und schließlich über H_2SO_4

[1]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch. 8. Aufl. 662ff. (1909).

[2]) Bei Verwendung von Blut wird man den Blutkuchen erst mechanisch zerkleinern und dann die Masse in der oben zu beschreibenden Weise weiterverarbeiten.

[3]) Das 3—4fache Volum wird meist genügen, doch hat man schon bis zu 15 Volumina Alkohol angewandt, z. B. *Erben*, Chemische Zusammensetzung des Blutes bei Tuberculosis pulmonum. Zeitschr. f. Heilkunde. 26. 245 (1895).

getrocknet. Der Rückstand wird mit Äther ausgezogen, das Ätherunlösliche abfiltriert und wiederholt mit Äther gewaschen.

1. Der Rückstand — das Ätherunlösliche wird mit Wasser in eine tarierte Schale gespült, die Aufschwemmung auf dem Wasserbad zur Trockene gebracht, der Rückstand bei 110° getrocknet und gewogen. Das Gewicht gibt die Summe der in Alkohol löslichen Extraktivstoffe. Das Gewicht der Asche, vermehrt um das Gewicht der Asche des wässerigen Auszugs (siehe oben), gibt die Summe der löslichen Salze. Viel genauer ist es freilich, die beiden Aschen zu vereinigen, mit Wasser auszukochen und das wasserlösliche von eventuell wasserunlöslichen zu trennen. Das letztere wäre dann dem Rückstand zuzuzählen, den man beim Veraschen der Proteinstoffe bekommt.

2. Das ätherische Filtrat wird bis auf ein kleines Volumen abdestilliert, in ein gewogenes Becherglas übergeführt und der Kolben mit Äther und Alkohol nachgespült. Bei mäßiger Wärme verdunstet man die Lösung auf dem Wasserbad und trocknet den Rückstand vor der Wägung im Vakuum über H_2SO_4. Dann löst man den Rückstand in Alkohol, fügt alkoholische Kalilauge zu, kocht die Mischung etwa 1 Stunde auf dem Wasserbad, verdunstet nach dem Verseifen den Alkohol und löst den Rückstand im Wasser. Diese Lösung wird mehrmals mit Äther ausgeschüttelt.

Die vereinigten Ätherlösungen werden verdunstet, der Rückstand mit Petroläther aufgenommen, wobei das eventuell vorhandene Cholesterin in Lösung geht. Nach dem Verdunsten des Petroläthers bestimmt man das Cholesterin nach *Windaus*. Vermutet man in dem Petrolätherrückstand neben Cholesterin noch andere Substanzen, so schüttelt man das Filtrat vom Digitonincholesterid nach dem Ansäuern mit Salzsäure, mit Äther oder Petroläther aus und vereinigt den Rückstand dieses Auszugs mit der von der Verseifung herrührenden wässerigen alkalischen Lösung und untersucht sie in früher geschilderter Weise (S. 162 ff.).

In diesem Teil findet sich der Phosphor der Phosphatide, den man am besten nach der *Neumann*schen Methode bestimmt.

Berechnungen über die Menge des Fetts aus der Differenz des Gewichtes des Ätherauszugrückstandes und dem Resultat der Phosphorsäurebestimmung berechnet auf ein beliebiges Lezithin, z. B. Distearyllezithin [1]), sind natürlich sehr willkürlich, mögen aber trotzdem für manche Zwecke ganz wertvoll sein.

Zur Bestimmung von Erythrozyteneiweiß und Fibrin in einer Blutportion verfährt *Erben* [2]) folgendermaßen:

In einem Wägegläschen von etwa 30 *cm*³ Inhalt werden zuerst 0·025 bis 0·03 *g* wasserfreies Ammonoxalat abgewogen, dann läßt man unter dauerndem Umrühren das Blut hineinfließen und wägt nach dem Erkalten.

[1]) Welchem Gewicht natürlich noch das Cholesterin zuzuaddieren ist.

[2]) *Erben*, Chemische Zusammensetzung des Blutes usf. Zeitschr. f. Heilkunde. **26**. 245 (1895).

Hierauf wird das flüssig gebliebene Blut in 2 Zentrifugierröhrchen ausgeschleudert und das klare Plasma in einem Wägegläschen gewogen. Dann spült man das Plasma mit etwas Wasser in ein Bechergläschen und bringt es durch ein kleines Tröpfchen Chlorkalziumlösung zur Gerinnung. Das Fibrin wird mit Hilfe von Glasstäbchen zerteilt, erst mit 0·9%iger, dann mit konzentrierter NaCl-Lösung zur Entfernung verschiedener Leukozytenbestandteile gewaschen, auf gewogenem Filter gesammelt, getrocknet und gewogen.

Das Filtrat vom Fibrin wird mit Wasser verdünnt und mit dem gleichen Volumen einer konzentrierten neutralen Ammonsulfatlösung zur Ausfällung des Globulins[1]) versetzt. Dasselbe wird auf einem gewogenen Filter gesammelt, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gut gewaschen, weiterhin mit Alkohol und mit Äther behandelt und schließlich durch Trocknen bei 120° wasserunlöslich gemacht.

Schließlich wäscht man mit heißem Wasser, trocknet, wägt, verascht und zieht das Gewicht der Asche vom Gewicht des Niederschlages ab.

Das Sediment[2]), von dem, wie oben erwähnt, das zellfreie Plasma abgenommen wurde, wird mit 0·9%iger NaCl-Lösung[3]), mit der man zuerst das Wägegläschen ausgespült hat, aufgeschüttelt. Man schleudert die Blutkörperchen aus, hebt die klare Flüssigkeit, aus der man etwa noch aufgeschwemmte Erythrozyten durch abermaliges Zentrifugieren in einem neuen Röhrchen gewinnen kann, ab, schwemmt das Sediment wieder in 0·9%ige NaCl-Lösung auf, zentrifugiert wieder und verfährt in der gleichen Weise noch etwa 2mal.

Erben führt dann die Bearbeitung in folgender Weise weiter: Die von Waschflüssigkeit möglichst befreiten Erythrozytensedimente werden mit wenig Wasser in ein Becherglas gespült, dort mit der 15fachen Menge absoluten Alkohols gefällt und der Niederschlag so weiter behandelt wie oben beim Plasma, auch das Filtrat von der Alkoholfällung ist wie oben weiterzubehandeln.

Soweit ich sehe, wäre also nach dem Verfahren von *Erben* das Plasma vollständig abzuheben, zu wägen und die Differenz zwischen Blutgewicht und Plasmagewicht als „Blutkörperchen" in Rechnung zu setzen.

---

[1]) Über die Bestimmung des Albumins macht *Erben* keine Angaben. Die Bestimmung würde in der Weise auszuführen sein, daß man die verschiedenen wässerigen Filtrate vereinigt, einengt (bei etwa 60°) bis zur Trockene und schließlich den Rückstand über Schwefelsäure trocknet, dann würde man die trockene Masse mit Alkohol und anschließend mit Äther erschöpfen; das Ungelöste wird bei 120° getrocknet und die trockene Masse mit heißem Wasser erschöpft. Das Ungelöste wird nach neuerlicher Behandlung mit Alkohol und Äther getrocknet, gewogen und verascht. Die Asche zieht man von dem Gewicht des Trockenrückstandes ab und setzt die Differenz als Albumin in Rechnung. (Auch durch Dialyse kann man die Hauptmenge anorganischer Salze entfernen.)

[2]) Das Sediment enthält natürlich auch die Leukozyten.

[3]) *Erben* wandte 3%ige Kochsalzlösung an, doch scheint mir 0·9%ige der osmotischen Verhältnisse wegen empfehlenswerter.

Dabei begeht man einen Fehler, dessen Größe unkontrollierbar und wechselnd ist. Es empfiehlt sich deshalb nach der Analyse des Plasmas und nach dem Auswaschen der Körperchenmaße in einem aliquoten Teil dieses Sediments das Volumen der Blutkörperchen zu bestimmen und einen anderen aliquoten Teil in der oben geschilderten Weise zu untersuchen. Zur Bestimmung des Körperchenvolums hätte man das Verfahren von *Warburg*[1]) anzuwenden.

Nach dem Waschen der Körperchen mit einer isotonen Kochsalzlösung werden 5 cm^3 des Blutkörperchenbreis mit 5 cm^3 einer isotonen Natriumsulfatlösung vermischt und die Mischung zentrifugiert. In 5 cm^3 der über dem Sediment stehenden Flüssigkeit bestimmt man den Chlorgehalt durch Titration mit $\frac{n}{10}$ $AgNO_3$ und Chromat als Indikator. Aus dem gefundenen Chlor kann man, da der Titer der zum Waschen der Blutkörperchen benutzten NaCl-Lösung als bekannt vorausgesetzt wird, errechnen, wieviel Kubikzentimeter NaCl-Lösung in den angewandten 5 cm^3 Blutkörperchenbrei sich finden und kennt damit natürlich auch das Volum der Blutkörperchen.

Wendet man größere Blutquantitäten an, als sie für die oben geschilderte quantitative Gesamtblutanalyse nötig sind, so lassen sich bei Einhaltung des gleichen Verfahrens — wobei natürlich die Veraschung wegfällt — die einzelnen Bestandteile des Blutes nacheinander aus einer Blutportion isolieren.

Es wird sich dieses Verfahren aber nur dann empfehlen, wenn die zur Verfügung stehende Blutmenge relativ klein ist. Denn wollte man bei einer kleinen Blutmenge für jede nachzuweisende oder zu isolierende Substanz eine besondere Portion in Arbeit nehmen, so könnte es leicht dahin kommen, daß, auch wenn eine gesuchte Substanz im Blut vorhanden ist, ihr Nachweis mißlingt, weil eben die zur Untersuchung verwendete Quantität ungenügend war. Hat man größere Blutmengen zur Verfügung, so ist es meist zweckmäßiger, für jede Substanz eine besondere Blutportion in Arbeit zu nehmen, schon deshalb, weil bei Befolgung der oben gegebenen Vorschriften der für die Untersuchung nötige Zeitaufwand mit wachsender Blutmenge ebenfalls erheblich größer wird.

In manchen Fällen, besonders bei Aufarbeitung sehr großer Blutmengen, ist es auch ganz empfehlenswert, das Blut (Serum, Plasma) nach Entfernung der Proteinstoffe zur Trockene einzudampfen. Man kann zu diesem Zweck in folgender Weise verfahren.[2])

Serum wird mit verdünnter Essigsäure eben angesäuert und mit dem dreifachen Volumen 90%igen Alkohols versetzt. Die alkoholisch wässerige

[1]) *Otto Warburg*, Über Beeinflussung der Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen an roten Blutkörperchen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **69**. 452/62 (1910).

[2]) *E. Letsche*, Beiträge zur Kenntnis der organischen Bestandteile des Serums. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **53**. 31/112 (1907).

Flüssigkeit bleibt über dem Niederschlag unter wiederholtem Umschütteln 36—48 Stunden stehen, dann trennt man sie durch Kollieren von dem Niederschlag; diesen zerreibt man mit Alkohol (96%ig) zu einem dünnen Brei und erwärmt auf dem Wasserbad auf 30—35°, wonach man den Niederschlag noch warm auf der Nutsche absaugt; den noch feuchten Niederschlag zerreibt man — er darf dabei nicht an den Fingern kleben, ist dies der Fall, so muß die Behandlung mit Alkohol wiederholt werden — und extrahiert ihn erst mit Alkohol, dann mit Äther.[1] Diese Extrakte vereinigt man mit dem alkoholisch-wässerigen Hauptfiltrat.

Dieses Hauptfiltrat wird im Vakuum bei einer 40° jedenfalls nicht wesentlich übersteigenden Temperatur eingedampft. (Bei genügend großen Vakuumapparaten geht diese Arbeit sehr rasch.[2]) Der beim Eindampfen bleibende Rückstand wird noch feucht auf Ton gebracht, in einzelne Stücke zerteilt und im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Anderen Tags ist die Masse in der Regel soweit trocken, daß sie sich zu einem groben Pulver zerreiben läßt; nach weiterem 1—2tägigem Stehen über H_2SO_4 zerreibt man möglichst rasch zu einem staubfeinen Pulver, trocknet noch ein drittes Mal und füllt das sehr hygroskopische Pulver möglichst rasch in vollkommen trockene Gläser, die sofort mit Paraffin verschlossen werden.

Zur Zerlegung in einzelne der weiteren Untersuchung leichter zugängliche Fraktionen extrahiert man die vollkommen trockene Masse der Reihe nach mit Petroläther, Äther, Alkohol (99%) und Wasser.

Ganz einwandfrei ist dieses Verfahren des Eindampfens auch beim Einhalten einer niedrigen Temperatur nicht; es gehen geringe Mengen N-haltiger Stoffe unter Abspaltung von NH_3 in die Brüche; wie weit Phosphatide dabei sich zersetzen, wäre erst noch zu prüfen.

VII. Bestimmung der Verteilung einzelner Bestandteile des Blutes auf Serum (Plasma) und Formelemente.

Die erste Aufgabe, die man für den angegebenen Zweck zu lösen hat, ist die Feststellung des Verhältnisses von Serum und Formelementen in dem zu untersuchenden Blut; von ihrer genauen Lösung hängt die Genauigkeit der übrigen Bestimmungen sehr wesentlich ab. Welches der in Abschnitt II angegebenen Verfahren man zur Bestimmung dieses Verhältnisses anwenden wird, hängt im speziellen Fall unter anderem auch davon ab, über welcher Stoffe Verteilung man Aufklärung wünscht. Für manche Zwecke mag das Verfahren von *Stewart* gewisse Vorteile bieten:

[1]) Diese Extrakte — Alkohol und Äther — können zur Isolierung von Cholesterinestern nach *Hürthle* verwendet werden. Der Niederschlag enthält wesentliche Mengen wasserlöslicher Bestandteile nicht; um ganz sicher zu gehen, daß man alles Lösliche entfernt hat, kann man den Niederschlag erst bei 120° trocknen und dann mit Wasser auskochen und diese Lösung zum Hauptfiltrat zugeben.

[2]) Bei ziemlich primitiven Einrichtungen, die mir zur Verfügung standen, nahm das Eindampfen der aus 7 *l* Serum resultierenden Flüssigkeitsmenge (rund etwa 35 *l*) 2½—3 Tage bei 9stündiger täglicher Arbeitszeit in Anspruch.

bei bestimmten Blutarten (Pferd, Schwein, Kaninchen) kommt man am raschesten zum Ziel, wenn man dem von *Bunge* angegebenen Verfahren, das Natron im Gesamtblut und Serum zu bestimmen, folgt. Einer allgemeineren Verwendung ist das *Bleibtreu*sche Verfahren fähig. Handelt es sich um die Verteilung der Eiweißstoffe, so wird man eines oder das andere von *Hoppe-Seylers* Verfahren anwenden, da man hierbei ja eben diese Stoffe bestimmt.

Hat man das Verhältnis von Serum und Körperchen auf die eine oder andere Art ermittelt, so braucht man nur die Substanz, deren Verteilung ermittelt werden soll, einmal im Blut und einmal im Serum zu bestimmen[1]) und hat damit die Zahlen, die zur Berechnung nötig sind, ermittelt.

Hat man die Aufgabe, alle wichtigeren im Blut sich findenden Substanzen in ihrer Verteilung auf Serum und Formelemente zu bestimmen, so wird man sich am besten an die Angaben von *Hoppe-Seyler-Thierfelder*[2]) halten.

Man bestimmt mit Hilfe einer der auf Seite 151 beschriebenen Methoden *Hoppe-Seylers* das Verhältnis von Serum zu Formelementen. Dabei wird der Prozentgehalt des Serums an Proteinstoffen und der Prozentgehalt des Blutes an Proteinstoffen der Blutkörperchen direkt bestimmt. Die letztere Bestimmung fällt aber etwas zu niedrig aus, wenn man, wie an anderer Stelle[3]) angegeben wird, die Gesamtasche von dem Gewicht des trockenen Filterrückstandes abzieht; denn diese Gesamtasche enthält auch das Eisen aus dem Hämoglobin. Um diesen Fehler zu eliminieren, bestimmt man den Eisengehalt einer Blutportion, berechnet das Resultat auf 100 *g* Blut und addiert das Resultat dieser Bestimmung zu der Differenz von Trockengewicht des Eiweißniederschlags und Gewicht der in ihm enthaltenen Asche (beide Größen natürlich ebenfalls auf 100 *g* Blut berechnet). Die Zahl, die man auf diese Weise erhält, gibt an, wieviel Gramm Proteinstoffe in 100 *g* Blut auf die Blutkörperchen entfallen; wieviel Proteinstoffe in 100 *g* Blut auf das Serum kommen, erfährt man, wenn man den Prozentgehalt des Serums an Proteinstoffen umrechnet auf die Menge Serum, die in 100 *g* Blut enthalten ist.

Man führt dann weiter eine Blutfarbstoffbestimmung nach einer der von *Franz Müller*[4]) beschriebenen Methoden aus. Der gefundene Prozentgehalt gibt zugleich auch an, wie viel Hämoglobin in der in 100 *g* Blut enthaltenen Blutkörperchenmenge sich findet, da ja das Hämoglobin nur in den Körperchen vorkommt.

Wenn man die auf diesem Wege gefundene, in 100 *g* Blut enthaltene Hämoglobinmenge abzieht von der Proteinmenge, die in den Blutkörperchen

---

[1]) Nach Methoden, die weiter oben beschrieben sind.

[2]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, Handbuch der physiol. u. pathol.-chem. Analyse. 8. Aufl. Berlin 1909. S. 685.

[3]) Dieses Handbuch. Bd. 2. S. 373 (1910).

[4]) Dieses Handbuch. Bd. 3. S. 705 ff. (1910).

von 100 *g* Blut sich findet, so erfährt man die Menge der Proteinstoffe, die neben dem Blutfarbstoff in den Blutkörperchen von 100 *g* Blut enthalten ist.

Weiterhin bestimmt man in etwa 30—50 cm^3 Blut Cholesterin, Phosphatide, lösliche und unlösliche Salze [1], rechnet die Resultate auf 100 *g* Blut um und führt die gleichen Bestimmungen in einer entsprechenden Menge Serum aus. Die im Serum erhaltenen Werte sind dann auf die Menge Serum, die 100 *g* Blut enthalten, umzurechnen.

Zieht man diese Zahl ab von der ersten für das Blut bestimmten, so erfährt man die Mengen der bestimmten Stoffe, wie sie in den Blutkörperchen von 100 *g* Blut sich finden.

Genau das gleiche Verfahren ist anzuwenden für Zucker, für Harnstoffe, Milchsäure usw., für Trockensubstanz und Aschenbestandteile.

Untersuchung der Lymphe.

Die Bestandteile der Lymphe (und des Chylus) sind qualitativ die gleichen wie die des Blutes.

Die geformten Elemente Leukozyten und unter Umständen auch Erythrozyten hat man bis jetzt der Schwierigkeit ihrer Gewinnung wegen noch nicht zum Gegenstand chemischer Untersuchungen gemacht.

Zur Untersuchung der Lymphe, des Lymphplasmas und Lymphserums finden die gleichen Methoden wie beim Blut Anwendung; irgend welche Besonderheiten sind nicht zu beachten.

Methoden zur Aufarbeitung der Zerebrospinalflüssigkeit.

Untersuchungen über die Zusammensetzung normaler menschlicher Zerebrospinalflüssigkeit sind bis jetzt kaum gemacht worden. Die untersuchten Flüssigkeiten stammten vielmehr entweder von Kranken, bei welchen eine Entziehung dieser Flüssigkeit durch Punktion vom ärztlichen Standpunkte aus geboten schien oder aus Leichen. Dagegen ist von gesunden Kälbern stammende Zerebrospinalflüssigkeit von *Nawratzki* eingehend untersucht worden. Ob die zu untersuchende Flüssigkeit von gesunden oder kranken Individuen stammt, ist für die zu befolgende Methodik nebensächlich, wenn auch pathologische Zerebrospinalflüssigkeit in ihrer Zusammensetzung sowohl nach der qualitativen als auch nach der quantitativen Seite Abweichungen von normaler Flüssigkeit zeigen wird.

Bei der Untersuchung der Zerebrospinalflüssigkeit sowie bei der Bestimmung einzelner ihrer Bestandteile hat man sich im großen und ganzen an die für das Serum gebräuchliche und im Vorhergehenden ausführlich beschriebene Methodik zu halten. Für die Isolierung und Bestimmung einiger

[1] Die Bestimmung kann im Anschluß an das im Abschnitt VI wiedergegebene Verfahren erfolgen; oder aber kann man jeden einzelnen Bestandteil nach den früher beschriebenen Methoden in einer besonderen Blutportion und einer besonderen Serumportion bestimmen.

Bestandteile sind im Folgenden eine Anzahl Methoden beschrieben, die sich gegenüber den entsprechenden Methoden, die für das Serum in Anwendung kommen, meist durch größere Einfachheit auszeichnen.

Die Einteilung entspricht der beim Blutserum eingehaltenen; es finden sich nebeneinander Methoden zur Isolierung und zur quantitativen Bestimmung, da zur Isolierung und zum Nachweis der einzelnen Bestandteile in der Regel Methoden Anwendung finden, die ohne weiteres auch für quantitative Zwecke brauchbar sind.

1. Eiweißstoffe.

Zur quantitativen Bestimmung von Serumglobulin verfährt *Panzer*[1]) folgendermaßen:

50 *cm*³ Flüssigkeit werden durch einige Tröpfchen verdünnter Essigsäure neutralisiert und die Lösung bei 40° mit $MgSO_4$ gesättigt. Der Niederschlag wird auf gewogenem Glaswollfilter abfiltriert, mit gesättigter $MgSO_4$-Lösung gewaschen und auf dem Trichter bei 110° getrocknet, um das Eiweiß zu koagulieren. Alsdann wäscht man mit Wasser aus, trocknet wieder und wägt.

Das Filtrat dieser Fällung, durch Dialyse von der Hauptmenge Salze befreit, scheidet beim Kochen und nachherigen Ansäuern mit verdünnter Essigsäure eine beträchtliche Menge koagulierbares Eiweiß — Serumalbumin — aus.

Das gleiche Verfahren benutzte auch *Halliburton.*[2])

Zur Bestimmung des in der Zerebrospinalflüssigkeit enthaltenen Gesamteiweiß verfährt *Frenkel-Heiden*[3]) folgendermaßen:

Die Flüssigkeit (3—10 *cm*³) wird mit der 10—15fachen Menge Alkohol gefällt, der Niederschlag nach 24stündigem Stehen auf einem kleinen Filter gesammelt, sorgfältig ausgewaschen und zur N-Bestimmung nach *Kjeldahl* verwendet.

Nawratzki[4]) dagegen fällt die Eiweißstoffe durch Hitzekoagulation bei ganz schwach essigsaurer Reaktion. Den Eiweißniederschlag sammelt er auf gewogenem Filter, wäscht ihn gründlich aus (mit Wasser, Alkohol und Äther), trocknet ihn bei 100° und wägt.

2. Kohlehydrate.

Zum Nachweis von Glukose in Z.-Flüssigkeit von Gesunden hat *Nawratzki*[5]) folgenden Weg eingeschlagen:

[1]) *Th. Panzer,* Zur Kenntnis der Zerebrospinalflüssigkeit. Wiener klin. Wochenschr. 1899. 805/7.

[2]) *W. D. Halliburton,* On cerebrospinal fluid. Journ. of Physiol. **10.** 232/58 (1889).

[3]) *Frenkel-Heiden,* Zur Chemie der Zerebrospinalflüssigkeit. Biochem. Zeitschr. 2. 188/89 (1907).

[4]) *Nawratzki,* Zur Kenntnis der Zerebrospinalflüssigkeit. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 23. 532 (1897).

[5]) *Nawratzki,* Zur Kenntnis der Zerebrospinalflüssigkeit. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 23. 532 (1897).

Zur Fällung von Eiweiß wird die Lösung mit dem mehrfachen Volum Alkohol versetzt, das Filtrat bei etwa 40° (am besten im Vakuum) eingedampft und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Diese Lösung wird mit neutralem Bleiazetat versetzt, der Niederschlag ausgewaschen und das Filtrat (samt Waschwasser) entbleit mit H_2S. Das Filtrat von PbS wird stark eingeengt und zwar etwa auf $^1/_{24}$ des ursprünglichen Volumens.

In dieser Lösung läßt sich Glukose nachweisen mit Hilfe des Polarisationsapparates, mit Hilfe der Reduktionsproben von *Fehling* und *Nylander* und mit Hilfe der Gärprobe. Weiter gelingt auch die Darstellung von Glukosazon nach dem üblichen Verfahren.

Panzer[1]) weist mit Hilfe der gleichen Reaktionen die Gegenwart von Glukose nach, nachdem er für diesen Zweck die Zerebrospinalflüssigkeit in folgender Weise vorbereitet hat:

Etwa 100 *cm*³ Z.-Flüssigkeit werden mit Essigsäure schwach angesäuert. Zu dieser Lösung fügt man Bleizucker, solange noch eine Fällung entsteht. Das Filtrat macht man mit NH_3 alkalisch, filtriert wieder und wiederholt die Fällung mit NH_3 und Bleizucker so lange, als noch eine Fällung auftritt. Die verschiedenen durch NH_3 und Bleizucker erhaltenen Niederschläge werden in gelinder Wärme mit Hilfe von H_2SO_4 zersetzt, das Filtrat genau neutralisiert und diese Lösung zur Isolierung von Phenylglukosazon verwendet.

Diese beiden Methoden eignen sich bei Einhaltung quantitativer Kautelen natürlich auch zur quantitativen Bestimmung der Glukose, dabei verdient die erstere Methode m. E. den Vorzug. Statt die Flüssigkeit mit Hilfe von Alkohol vom Eiweiß zu befreien, kann man natürlich auch Hitzekoagulation hierzu verwenden oder eine der von *Rona* und *Michaelis* angegebenen, bei der Blutzuckerbestimmung beschriebenen Methoden.

3. Fett und fettähnliche Substanzen.

Geringe Mengen Fett, Fettsäuren und Cholesterin hat *Panzer* in der Z.-Flüssigkeit eines Falles von Hydrokephalus qualitativ nachweisen können, indem er die eiweißfreie Flüssigkeit sowohl bei alkalischer wie bei saurer Reaktion ausschüttelte und die Ätherauszüge „in der gewohnten" Weise aufarbeitete.

Zum Nachweis und zur Isolierung von Cholesterin, das in normaler Flüssigkeit nicht zu finden ist, hat *Pighini*[2]) Lumbalflüssigkeit von Geisteskranken in unten zu beschreibender Weise aufgearbeitet.

25 *cm*³ Lumbalflüssigkeit werden im Scheidetrichter wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Der nach dem Verdunsten des Äthers bleibende

[1]) *Th. Panzer*, Zur Kenntnis der Zerebrospinalflüssigkeit. Wiener klin. Wochenschr. 1899. 805.

[2]) *G. Pighini*, Über den Cholesteringehalt der Lumbalflüssigkeit einiger Geisteskrankheiten. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **61**. 508/16 (1909).

Rückstand wird in siedendem absoluten Alkohol gelöst und nach dem Verfahren von *Ritter*[1]) verseift.

Die Verseifung gelingt ebensogut in Benzol, wenn man kleine Stücke Natrium und soviel absoluten Alkohol hinzufügt, bis das Natrium ganz gelöst ist. Nach 3—4stündigem Sieden am Rückflußkühler filtriert man und wäscht die Benzollösung so oft mit destilliertem Wasser, bis dieses nicht mehr alkalisch reagiert. Die Benzollösung wird dann langsam verdunstet, der Rückstand in Alkohol gelöst, und die Lösung zum Sieden erhitzt, während man ihr soviel Wasser zugießt, bis sie eben trüb wird. Man klärt die Lösung dann wieder durch ein paar Tropfen Alkohol, filtriert sie warm, engt sie auf ein kleines Volumen ein und läßt sie langsam abkühlen.

Die Rückstände, die man beim Verdunsten des Alkoholauszuges erhält, den man nach *Ritters* oder dem oben beschriebenen Verfahren gewonnen hat, enthalten oft außer dem gesuchten Cholesterin auch noch andere Substanzen, welche die Kristallisation und die Abscheidung des Cholesterins hindern. Um diese Substanzen zu entfernen, fällt man nach *Pighini* die alkoholische Lösung mit Bleizucker, der diese Substanzen zum großen Teil niederschlägt. Das Filtrat wird entbleit, auf ein kleines Volum eingeengt und das auskristallisierende Cholesterin durch Umkristallisieren aus Alkohol gereinigt. Sollte es nicht möglich sein, Kristalle zu erhalten, so löst man den beim Verdunsten des Alkohols bleibenden Rückstand in Chloroform und versucht, mit dieser Lösung die Cholesterinreaktion zu erhalten.[2])

4. Extraktivstoffe.

a) N-haltige Substanzen.

Harnstoff hat *Cavazzani*[3]) einfach in der Weise nachgewiesen, daß er die neutrale Lösung einengte — 80 cm^3 auf zirka 18 cm^3 — und in dieser Lösung nach *Hüfners* Methode den Harnstoff mittels Bromlauge zersetzte.

Gumprecht[4]) weist den Harnstoff ebenfalls mit Hilfe der eben erwähnten Methode nach, sucht aber den Harnstoff zuerst durch Behandlung der Z.-Flüssigkeit in folgender Weise in möglichst reiner Lösung zu erhalten: 42 cm^3 Flüssigkeit werden mit 120 cm^3 Alkohol versetzt, der Niederschlag nach etwa 24stündigem Stehen abfiltriert und mit Alkohol

[1]) *Ritter*, Über die Methoden, die zur Abscheidung des Cholesterins aus den Fetten und ihrer quantitativen Bestimmung verwendbar sind. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 34. 430 (1901/02). Vgl. auch S. 169 dieser Arbeit.

[2]) Zweifellos wird auch hier statt der beschriebenen Reinigungsmethode das Verfahren von *Windaus* zur Isolierung des Cholesterins gute Dienste leisten. — Ferner wird man die vereinigten alkalischen wässerigen Lösungen zur Bestimmung der Fettsäuren — vielleicht nach dem Verfahren von *Kumagawa-Suto* — verwenden können.

[3]) *E. Cavazzani*, Weiteres über die Zerebrospinalflüssigkeit. Zentralbl. f. Physiol. 10. 145/147 (1896).

[4]) *Gumprecht*, Cholin in der normalen und pathologischen Spinalflüssigkeit etc. Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin. Wiesbaden 1900. S. 326/48.

ausgewaschen. Das Filtrat engt man bei einem Druck von weniger als 200 *mm* und bei möglichst niederer Badtemperatur (zirka 35—40°) auf etwa 10 *cm*³ ein und läßt diesen Rest im Vakuum über H_2SO_4 bei Zimmertemperatur verdunsten. Der Rückstand wird in Alkohol aufgenommen, die Lösung filtriert und zur Harnstoffbestimmung verwendet.

Wie *Carazzani*[1], so hat auch *Panzer* Hydrokephalusflüssigkeit auf Harnstoff untersucht; während, wie oben angedeutet, *Carazzani* Harnstoff nachweisen konnte mit Hilfe eines recht einfachen Verfahrens, ist *Panzer*[2]) der Nachweis auf folgendem Wege nicht geglückt.

Die Z.-Flüssigkeit wird mit dem 3fachen Volum Alkohol versetzt; der Eiweißniederschlag wird abfiltriert und mit Alkohol gewaschen. Filtrat und Waschflüssigkeit dampft man zur Trockene ein; den Rückstand zieht man mit Alkohol aus, verdunstet diese Lösung wieder und löst den Rückstand in Wasser (möglichst wenig). Auf Zusatz von konzentrierter reiner HNO_3 waren Kristalle von salpetersaurem Harnstoff nicht zu erhalten; auch Merkurinitrat gab nur eine ganz unbedeutende Trübung.

Die Angaben über den Cholingehalt der Zerebrospinalflüssigkeit sind sehr widersprechend. Die differenten Resultate liegen sicher nicht an kleinen Verschiedenheiten der Methodik, sondern sind zweifellos dadurch zu erklären, daß Cholin bei gewissen Krankheiten auftritt, bei anderen dagegen nicht. In normaler Zerebrospinalflüssigkeit scheint es zu fehlen, wenigstens macht *Nawratzki* über seinen Nachweis in der Z.-Flüssigkeit von Kälbern keine Angaben.

Donath verfährt zum Nachweis von Cholin in der Z.-Flüssigkeit von Epileptischen in folgender Weise[3]):

20—30 *cm*³ der Flüssigkeit werden mit 0·5—1 *cm*³ einer 5%igen reinen Lösung von Na_2CO_3 versetzt, um Kalzium, Magnesium und Eisen zu entfernen. Das Filtrat von diesem Niederschlag wird im Wasserbad zur Trockene verdampft und der Rückstand mit absolutem Alkohol aufgenommen. Diese Lösung wird mit einigen Tropfen HCl eben angesäuert und wieder zur Trockene verdunstet. Den Rückstand, der neben Cholinchlorhydrat auch noch anorganische Chloride enthält, löst man zur Abtrennung eben dieser anorganischen Chloride wieder in absolutem Alkohol und versetzt diese Lösung mit einer alkoholischen Lösung von Platinchloridchlorwasserstoff. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Alkohol gewaschen, getrocknet und gewogen.

Donath löst dann die Kristalle in Wasser, läßt die Lösung langsam verdunsten und sucht die Kristalle noch auf Grund ihres Lichtbrechungs-

[1]) Siehe Anm. 3, S. 218.

[2]) *Th. Panzer*, Zur Kenntnis der Zerebrospinalflüssigkeit. Wiener klin. Wochenschr. 1899. 805/7.

[3]) *J. Donath*, Detection of the Choline in the cerebrospinal fluid by means of the polarisation microscope. Journ. of Physiol. 33. 211/19 (1905/06). — Siehe auch *J. Donath*, Vorkommen und Bedeutung des Cholins in der Zerebrospinalflüssigkeit etc. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 39. 526/44 (1903).

vermögens (Doppelbrechung) und ihrer chromatischen Polarisation zu charakterisieren.

Gumprecht[1]) verfährt in ganz ähnlicher Weise, begnügt sich aber nicht mit der Isolierung der Platindoppelverbindung, sondern zerlegt diese mit H_2S, filtriert den Niederschlag ab und prüft noch mit Hilfe einiger weiterer Reaktionen auf Cholin. (JK gibt Nadeln und lichtkaffeebraune Prismen. $AuCl_3$ gibt Kristalle. Phosphormolybdänsäure gibt Fällung usf.)

Rosenheim[2]) unterläßt die etwas mühsame Isolierung und Reinigung der Platinverbindung und gibt zu einer Probe des Rückstandes von der Alkohollösung, wie sie zur Isolierung der Platinverbindung gewonnen wird, eine starke Lösung von Jod in Jodkalium. Dabei bilden sich die charakteristischen Kristalle von Cholinperjodid.

b) N-freie Extraktivstoffe.

Gumprecht[3]) isoliert Milchsäure aus Z.-Flüssigkeit, indem er diese mit Schwefelsäure ansäuert, mit Äther die saure Lösung wiederholt ausschüttelt, den Äther verdunstet und den Rückstand in wenig Wasser aufnimmt. Mit dieser Lösung sollen dann die Milchsäurereaktionen angestellt werden.

Lehndorf und *Baumgarten*[4]) schütteln die angesäuerte Zerebrospinalflüssigkeit ebenfalls mit Äther aus; sie verdunsten dann den Äther und nehmen den Rückstand in Wasser auf. Sie machen dann weiter folgende Angabe: „Ferner suchten wir die Identität der Milchsäure durch die Abspaltung des Aldehyds und Überführung desselben in Jodoform festzustellen. Den sicheren Nachweis aber erbrachten wir durch die Darstellung der charakteristischen Zinklaktatkristalle und durch deren Analyse.“ Nähere Angaben über die Methodik fehlen.

Eine eingehende Beschreibung zur Isolierung von Milchsäure aus Zerebrospinalflüssigkeit gibt *Lockemann*[5]), dessen Verfahren bei den Methoden zur Untersuchung des Serums beschrieben ist.

5. Anorganische Bestandteile.

Zur Bestimmung der Asche der Zerebrospinalflüssigkeit dampft man eine gemessene (oder gewogene) Quantität der Flüssigkeit in gewogener Schale ein. Handelt es sich zugleich um eine Trockensubstanzbestim-

[1]) *Gumprecht,* Cholin in der normalen u. pathol. Spinalflüssigkeit etc. Verhandl. d. Kongr. f. innere Med. Wiesbaden 1900. S. 326/48.

[2]) *O. Rosenheim,* Choline on the cerebrospinal fluid. Journ. of Physiol. **35**. 465/72 (1906/07).

[3]) *Gumprecht,* siehe oben bei 1.

[4]) *H. Lehndorf* und *A. Baumgarten,* Zur Chemie der Zerebrospinalflüssigkeit. Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther. **4**. 330/55 (1907).

[5]) *Lockemann,* Über den Nachweis von Fleischmilchsäure im Blut, Urin und Zerebrospinalflüssigkeit eklamptischer Frauen. Deutsche med. Wochenschr. **53**. 299 (1906). Siehe auch S. 195.

mung, so wird man zunächst bei 110° trocknen und wägen. Danach verascht man und wägt wieder. Dabei empfiehlt es sich, bei nicht allzu hoher Temperatur die Veraschung auszuführen und eine Spirituslampe statt der Gasflamme anzuwenden, da das Gas infolge seines S-Gehaltes vielfach die Ursache ist, daß der H_2SO_4-Gehalt zu hoch gefunden wird.

Handelt es sich um die Bestimmung einzelner anorganischer Bestandteile, so kann man zur Bestimmung der H_3PO_4 nach *Donath*[1]) in folgender Weise verfahren: Man kocht nach dem Ansäuern mit verdünnter Essigsäure die Flüssigkeit auf, filtriert von dem Niederschlag ab und fällt die Phosphorsäure mit molybdänsaurem Ammonium. Die weitere Behandlung des Niederschlages geschieht in der von *Neumann* angegebenen Weise auf titrimetrischem Wege.[2])

Den Gehalt an Chloriden bestimmten *Landau* und *Halpern*[3]) mit Hilfe der Methode von *Volhard-Salkowski* zweifellos in der einfach nur verdünnten Zerebrospinalflüssigkeit, wie dies auch *v. Hösslin*[4]) am Serum ausführte.

Die Alkalimetalle bestimmt man entweder nach den Angaben von *Nawratzki* oder nach dem Verfahren von *Halliburton*.

Nawratzki[5]) verascht die eingedampfte Zerebrospinalflüssigkeit und löst den Rückstand in einigen Tropfen HCl: diese Lösung wird mit NH_3 alkalisch gemacht und ein hierbei auftretender Niederschlag von Phosphaten abfiltriert; das Filtrat wird mit Ammonoxalat versetzt, der Niederschlag durch Filtrieren entfernt, das neue Filtrat mit $Ba(OH)_2$ im Überschuß versetzt, der Niederschlag von Baryumoxalat abfiltriert, aus dem Filtrat der Baryt durch H_2SO_4 entfernt und nach der Entfernung des $BaSO_4$ dieses Filtrat unter Zusatz von $(NH_4)_2CO_3$ eingedampft, gelinde geglüht und gewogen. Der Rückstand, der aus einem Gemenge von $K_2SO_4 + Na_2SO_4$ besteht, wird in wenig H_2O gelöst, diese Lösung mit HCl angesäuert und aus ihr, nachdem man zum Kochen erhitzt hat, die H_2SO_4 durch vorsichtigen Zusatz von $BaCl_2$ entfernt. Einen etwaigen Überschuß von $BaCl_2$ entfernt man durch wenige Tropfen sehr verdünnter H_2SO_4.

Das Filtrat wird nach dem Einengen mit Platinchloridlösung versetzt, die Lösung unter Zusatz von konzentrierter HCl bis fast zur Trockene abgedampft und mit starkem Alkohol übergossen. Das auf diese Weise isolierte K_2PtCl_6 wird auf gewogenem Asbestfilter gesammelt, getrocknet und im H_2-Strom reduziert. Nach dem Ausziehen des KCl wägt man das

[1]) *J. Donath*, Der Phosphorsäuregehalt der Zerebrospinalflüssigkeit. Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**. 141/48 (1904).

[2]) Das Nähere siehe dieses Handbuch. Bd. **1**. 419 (1909).

[3]) *Landau* und *Halpern*, Beitrag zur Chemie der Zerebrospinalflüssigkeit. Bioch. Zeitschr. **9**. 72 (1908).

[4]) Siehe den Artikel über Blut. S. 201.

[5]) *Nawratzki*, Zur Kenntnis der Zerebrospinalflüssigkeit. Zeitschr. f. physiol. Chem. **23**. 532 (1897).

Platin, berechnet hieraus den Kaliumgehalt und hat damit die Möglichkeit, aus dem Gewicht des Gemenges von $Na_2SO_4 + K_2SO_4$ auch das Natrium zu errechnen.

Das Verfahren von *Halliburton*[1]) ist etwas einfacher und kürzer:

Etwa 300 *cm*³ Z.-Flüssigkeit werden in einer Platinschale im H_2O-Bad eingetrocknet; der Rückstand wird auf dem Wasserbad 2—3mal mit rauchender Salpetersäure zur Trockene eingedampft — um die organische Substanz zu zerstören — und der Rückstand ebenfalls 2—3mal mit konzentrierter HCl eingedampft, um die Nitrate in Chloride überzuführen. Zur Lösung dieser Chloride fügt man $Ba(OH)_2$ bis zu eben alkalischer Reaktion, um Kalk, Magnesia und Phosphorsäure zu entfernen. Man filtriert, wäscht den Niederschlag gut aus (mit heißem Wasser), engt Filtrat und Waschwasser auf dem Wasserbad ein und entfernt geringe Mengen $Ba(OH)_2$ mit Hilfe von $(NH_4)_2CO_3$. Ist das $BaCO_3$ durch Filtrieren entfernt, dann dampft man das Filtrat in einer Platinschale zur Trockene ein, erhitzt den Rückstand auf Dunkelrotglut, um eventuell noch vorhandene Spuren organischer Substanz und die Ammonsalze zu entfernen. Der Rückstand wird gewogen und dann in H_2O gelöst; aus dieser Lösung fällt man in bekannter Weise das Kalium als K_2PtCl_6 und wägt dieses entweder direkt oder nachdem man wie oben Pt aus dem K_2PtCl_6 hergestellt hat.

Hat man nur die Aufgabe, Kalium allein zu bestimmen, so mag man die von *Myers*[2]) angegebene Methode anwenden, die darauf beruht, daß Kaliumsalze mit $Na_3Co(NO_2)_6$ schwer lösliches $K_3Co(NO_2)_6$ geben, daß man mit Kaliumpermanganat diese Verbindung oxydiert und mit Hilfe von Oxalsäure den hierzu nötigen Verbrauch an Permanganat feststellt.

---

[1]) *W. D. Halliburton*, On the cerebrospinal fluid. Journ. of Phys. **10**. 232/58 (1889).

[2]) *V. C. Myers*, The cerebrospinal fluid in certain forms of insanity, with special reference to the content of potassium. Journ. of biol. Chemistry. **6**. 115/31 (1909).

Die Blutgerinnung.

Von **P. Morawitz,** Freiburg i. B.

I. Einleitung.

Eine Besprechung der Methoden, die zum Studium und zur Aufklärung des Vorganges der Blutgerinnung dienen, ist insofern keine ganz leichte Aufgabe, als die theoretischen Vorstellungen über das Wesen dieses Prozesses auch heute noch — trotz zahlreicher Fortschritte — recht weit auseinandergehen. Dieser Umstand bringt es mit sich, daß auch das methodische Vorgehen der einzelnen Autoren sehr verschieden ist. Es gibt auf diesem Gebiete nur wenige Verfahren, die allgemeine Anerkennung finden. Vielfach schafft sich jeder Untersucher seine eigene Arbeitsmethode oder er paßt sie seinem Gedankengange an, indem er das Vorgehen älterer Beobachter modifiziert.

A. Neuere Anschauungen über Blutgerinnung.

Es erscheint mir notwendig, dem methodologischen, rein technischen Teil eine kurze theoretische Erörterung der modernen Vorstellungen über das Wesen des Gerinnungsvorganges vorauszuschicken. Sonst müssen die späteren Ausführungen vielfach unverständlich bleiben. Eingehend ist die Theorie der Blutgerinnung bei *Leo Loeb*[1]) und *Morawitz*[2]) besprochen.

Man kann den Gerinnungsvorgang zweckmäßig in zwei Phasen einteilen: Die erste Phase umgreift alle Veränderungen, welche die eigentliche Gerinnung, den Übergang des Fibrinogens in Fibrin, vorbereiten.

Über die einzelnen Vorgänge während dieser ersten Phase ist man sich noch durchaus nicht einig. *Alexander Schmidt*[3]) betrachtet die Gerinnung als einen fermentativen Vorgang. Nach seiner Ansicht besteht die erste Phase des Prozesses in allen Veränderungen, die im Blute die

---

[1]) *L. Loeb,* Neuere Arbeiten über die Blutgerinnung etc. Biochem. Zentralbl. VI. SA. (1907).

[2]) *Morawitz*, Die Gerinnung des Blutes. *Oppenheimers* Handb. d. Biochemie. Bd. 2. 2 (1908).

[3]) *Alexander Schmidt*, Zur Blutlehre. Leipzig 1892 und Weitere Beiträge zur Blutlehre. Wiesbaden 1895.

Entstehung von **Fibrinferment** veranlassen. Das strömende Blut (innerhalb der Gefäße) ist frei oder doch nahezu frei von Fibrinferment. Aus diesem Grunde bleibt es auch im lebenden Organismus flüssig. Erst wenn Blut in vitro oder in vivo in Kontakt mit benetzbaren Fremdkörpern kommt — auch die tote oder veränderte Gefäßwand kann als Fremdkörper wirken —, werden die Veränderungen eingeleitet, deren Folge die Bildung von Fibrinferment (Thrombin, Thrombase) ist. Welches sind nun diese Vorgänge? *Alexander Schmidt* hat seine eigenen Ansichten über diese Frage im Laufe seiner Untersuchungen mehrfach verändert. Es wird genügen, hier die von ihm in seinen letzten Arbeiten niedergelegte Theorie wiederzugeben. Diese gipfelt darin, daß die Bildung von Fibrinferment ein zellulärer Vorgang ist, respektive daß die zelligen Elemente des Blutes wie auch der übrigen Körperflüssigkeiten sich an der Gerinnung beteiligen. Nur durch ein Zusammenwirken von Zellen — *Schmidt* denkt in erster Linie an Leukozyten — und Plasma kann Fibrinferment entstehen. Im Plasma findet sich nämlich eine unwirksame Vorstufe des Thrombins, ein Prothrombin. Aus den Blutzellen treten unter geeigneten Bedingungen (Berührung mit Fremdkörpern!), vielleicht auch nach Zerfall von weißen Blutkörperchen, zymoplastische Substanzen in das Plasma aus, die das Prothrombin in den aktiven Zustand überführen. Geringe Mengen zymoplastischer Substanzen sollen allerdings auch schon im zirkulierenden Plasma gelöst vorhanden sein, doch ist ihre Wirkung durch einen noch unbekannten Mechanismus gehemmt. Das Fibrinferment oder Thrombin entsteht demnach durch das Zusammen- oder Aufeinanderwirken zweier Körper, von denen der eine ursprünglich dem Plasma angehört (Prothrombin), der andere (zymoplastische Substanz) vorwiegend den Blutzellen entstammt. In ähnlicher Weise wie zymoplastische Substanzen soll auch eine vorübergehende Erhöhung der Alkaleszenz des Plasma (durch Zusatz von $\frac{n}{10}$ NaOH) die Umwandlung von Prothrombin in wirksames Thrombin befördern.

Nach dieser von *Schmidt* entwickelten, hier nur in groben Zügen skizzierten Anschauung ist also die Schnelligkeit der Fermententwicklung im wesentlichen abhängig von dem Umfange der Schädigungen, denen die zelligen Elemente des Blutes unterworfen sind. Je größer die Berührungsfläche des Blutes mit Fremdkörpern ist, je rauher und unebener diese selbst sind, um so schneller und ausgiebiger wird sich die Abgabe zymoplastischer Substanzen, mithin also die Bildung der Thrombase, vollziehen müssen.

Dieser Auffassung von der ersten Phase des Gerinnungsvorganges wurde durch *Arthus*[1]) alsbald eine andere gegenübergestellt. *Arthus* und *Pagès*[2]) entdeckten die Bedeutung der **Kalksalze** für den Gerinnungsvor-

[1]) *Arthus*, Recherches sur la coagulation du sang. Thèse de doct. Paris 1890.

[2]) *Arthus* und *Pagès*, Nouvelle théorie chimique de la coagulation du sang. Arch. de Physiol. T. 22. 739—746 (1890).

gang. Ohne Kalksalze keine Gerinnung! Dieser Satz wurde bald von vielen Seiten bestätigt. Während aber *Arthus* und *Pekelharing*[1] im Zweifel waren, an welcher Stelle die Kalkwirkung einsetzt — sie dachten speziell auch an die Bedeutung der Ca-Ionen für die Überführung des Fibrinogens in Fibrin —, ergibt sich aus den Arbeiten *Hammarstens*[2] mit Sicherheit Folgendes: Ionisierte Kalksalze sind während der ersten Phase des Gerinnungsvorganges notwendig, sie ermöglichen die Umwandlung der unwirksamen Vorstufe des Fibrinfermentes, des Prothrombins, in aktives Thrombin. Dagegen kann die zweite Phase der Gerinnung, die Reaktion zwischen fertigem Thrombin und Fibrinogen, auch bei Abwesenheit ionisierter Kalksalze ablaufen.

In dieser Lehre, die sich aus den Arbeiten von *Arthus, Pekelharing* und besonders *Hammarsten* ergibt, haben die zymoplastischen Substanzen *Schmidts* keinen Platz mehr gefunden. Die beiden Vorstellungsreihen standen sich bis vor wenigen Jahren ziemlich unvermittelt gegenüber. (Nebenbei mag hier erwähnt werden, daß die Lehre von den zymoplastischen Substanzen im ganzen recht wenig bekannt war und demgemäß auch wenig diskutiert wurde.) Nach *Schmidt*, der übrigens die Bedeutung der Kalksalze überhaupt bestreitet, wäre das Prothrombin im Plasma enthalten, die zymoplastischen Substanzen hingegen stammten vornehmlich aus den Blutzellen. Demgegenüber wird nach *Arthus* und *Hammarsten* gerade das Prothrombin von den Zellen geliefert und trifft im Plasma auf Kalksalze, die dann die weitere Umwandlung in wirksames Thrombin übernehmen.

Versuche, die hier vorliegenden Widersprüche aufzuklären, sind von *Fuld* und *Spiro*[3] und *Morawitz*[4] unternommen worden. Ihre Arbeiten führten etwa zu folgenden Ergebnissen: Sicher sind Kalksalze für die Entstehung des Thrombins erforderlich. Insofern behält *Arthus* recht. Aber die Anschauungen *A. Schmidts* sind hiermit nicht unvereinbar. Zahlreiche Erfahrungen weisen darauf hin, daß außer den Kalksalzen mindestens zwei fermentähnliche Körper zur Entstehung des Thrombins beitragen: Die eine findet sich bereits im zirkulierenden Plasma und entspricht dem Prothrombin *Schmidts*. Es ist von *Morawitz* und *Nolf*[5] **Thrombogen** genannt worden. Der andere Körper stammt nach *Fuld-Spiro* und *Morawitz* vornehmlich aus den zelligen Elementen des Blutes. Wahrscheinlich ist er in erster Linie ein Derivat der Blutplättchen, vielleicht auch der Leukozyten. Er tritt erst extravaskulär auf gewisse Reize hin aus den

[1]) *Pekelharing*, Über die Bedeutung der Kalksalze für die Gerinnung des Blutes. Internat. Beiträge f. *Rud. Virchows* Festschrift. I (1891).

[2]) *Hammarsten*, Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 22. S. 333 (1896). — Derselbe: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fibrinbildung. Zeitschr. physiol. Chem. Bd. 28. S. 98 (1899).

[3]) *Fuld* und *Spiro*, Der Einfluß einiger gerinnungshemmenden Agentien auf das Vogelplasma. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 5. S. 171 (1904).

[4]) *Morawitz*, Die Chemie der Blutgerinnung. Ergebnisse d. Physiol. IV. S. 307 (1905).

[5]) *Nolf*, Contribution à l'étude de la coagul. du sang. 3e mémoire. Arch. internat de Physiologie. VI. H. 1 (1908).

Zellen in das Plasma über. Wie man sieht, entspricht Herkunft und Wirkungsweise dieses Körpers durchaus dem der *Schmidt*schen zymoplastischen Substanzen. Man könnte ihn unbedenklich mit diesen identifizieren, wenn nicht die gerinnungsbefördernden Stoffe der Zellen nach *Fuld* und *Morawitz* ganz andere chemische Eigenschaften hätten, als sie *Schmidt* seinen zymoplastischen Substanzen zuschreibt. Letztere sollen alkohollöslich und hitzebeständig sein, während die **Thrombokinase** fermentähnlich ist, also sehr labil gegen chemische Einflüsse verschiedener Art, besonders gegen hohe Temperaturen. Es erscheint daher berechtigt, die Thrombokinase nicht kurzerhand den zymoplastischen Substanzen gleichzusetzen.

Hiernach hätte man sich die erste Phase der Gerinnung folgendermaßen zu denken: Verläßt Blut das Gefäßsystem, treten seine geformten Elemente in Kontakt mit benetzbaren Fremdkörpern, so erfolgt eine Abgabe von Thrombokinase in das Plasma. Dieses enthält bereits Thrombogen und ionisierte Kalksalze, nach *Nolf*[1]) auch schon eine gewisse Menge Thrombokinase (Thrombozym). Durch ein Zusammenwirken der drei Faktoren entsteht Thrombin.

Wahrscheinlich ist der Ablauf der Erscheinungen aber noch komplizierter, als das nach den eben gegebenen Ausführungen scheinen mag. Zunächst dürften nach *Loeb*[2]) und *Muraschew*[3]) u. a. gerinnungshemmende Körper eine, einstweilen allerdings noch wenig geklärte Rolle spielen. Vielleicht sind sie für den flüssigen Zustand des Blutes von Bedeutung.

Hiernach wäre das strömende Blut in erster Linie deshalb flüssig, weil Thrombokinase entweder gar nicht oder doch in zu geringer Menge in das Plasma übertritt, so lange das Blut innerhalb lebender Gefäße weilt. Aber auch bei der Gerinnung in vitro scheint in der Regel nur ein Teil des gesamten Thrombogenvorrates in Thrombin übergeführt zu werden. Durch Zusatz von Thrombokinase zu Blutserum (also nach vollendeter Gerinnung) kann man die Bildung neuer, oft sehr beträchtlicher Thrombinmengen hervorrufen.

Indessen scheinen auch diese zuletzt wiedergegebenen Untersuchungen und Theorien noch nicht allen bisher beobachteten Tatsachen gerecht zu werden. Auch heute noch bestehen Meinungsverschiedenheiten über die wichtigsten Fragen der Gerinnungslehre.

Zunächst werden die beiden wichtigsten Tatsachen, die man *Alexander Schmidt* verdankt, neuerdings energischer als früher bestritten. Das ist die fermentative Natur des Gerinnungsvorganges auf der einen, die Beteiligung und ausschlaggebende Rolle der Blutzellen auf der anderen Seite.

---

[1]) *Nolf*, l. c.

[2]) *Loeb*, Versuche über einige Bedingungen der Blutgerinnung etc. *Virchows* Arch. Bd. 176. S. A. (1904).

[3]) *Muraschew*, Über die Spezifizität des Fibrinfermentes und seiner Vorstufen. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. 80. S. 187 (1904).

Schon vor langer Zeit hat *Wooldridge*[1]) auf Grund von Versuchen an Peptonplasma behauptet, die Gerinnung sei überhaupt kein fermentativer Prozeß, sondern Ausdruck der Verbindung zweier Fibrinogene, also der gegenseitigen Fällung zweier Kolloide. Diese, das A- und B-Fibrinogen, finden sich schon im strömenden Blute. Das Plasma selbst enthält also schon von vornherein alles, was zur Gerinnung erforderlich ist. Innerhalb lebender Gefäße bleibt es aber trotzdem flüssig, da gewisse, unbekannte Faktoren die Vereinigung der beiden Fibrinogene hindern.

Nolf[2]) hat neuerdings diese Theorie in stark veränderter Form wieder aufgenommen und den neugewonnenen Befunden angepaßt. In vielen Fragen nähert er sich den Anschauungen von *Fuld-Spiro* und *Morawitz*. Indessen bestreitet er die Fermentnatur des Gerinnungsvorganges. Gerinnung entsteht vielmehr durch gegenseitige Fällung mindestens dreier Kolloide, die in zwei Phasen vor sich geht: Zunächst vereinigen sich bei gleichzeitiger Anwesenheit ionisierter Kalksalze Thrombogen und Thrombozym (letzteres entspricht ungefähr der Thrombokinase anderer Autoren). Dann erfolgt die Fällung des Fibrinogens. Alle zur Gerinnung notwendigen Substanzen finden sich schon im zirkulierenden Plasma. Allerdings enthalten auch die Zellen des Blutes und der Gefäßwände Thrombozym, das wahrscheinlich ebenfalls in das Plasma übertritt. *Schmidts* Fibrinferment ist nach *Nolf* nicht Ursache, sondern Produkt der Gerinnung. Innerhalb lebender Gefäße bleibt Blut nicht deswegen flüssig, weil ihm ein für die Gerinnung notwendiger Faktor (etwa Thrombozym) fehlt, sondern vornehmlich deswegen, weil die drei Kolloide an sich nur geringe Neigung haben miteinander zu reagieren. Ihre Vereinigung erfolgt erst unter dem Einfluß gewisser thromboplastischer Substanzen mit größerer Geschwindigkeit. Die Zahl solcher Substanzen, die für die Gerinnung nicht absolut erforderlich sind, sie aber doch in hohem Grade befördern, ist sehr groß. Alle Gewebe, jedes Protoplasma enthält sie. Dagegen ist das Thrombozym nur den Zellen des Blutes und der Gefäßwände eigen. Auch Berührung mit Fremdkörpern verschiedener Art wirkt thromboplastisch. Gewebsextrakte enthalten meist ein Gemisch von Thrombozym (Thrombokinase) und thromboplastischen Substanzen, die etwa den zymoplastischen Substanzen *A. Schmidts* entsprechen. Gelingt es, Gewebszellen ganz frei von Blut und Gefäßen zu gewinnen (z. B. Sperma), so kann man in ihnen nur thromboplastische Substanzen, nicht aber Thrombozym nachweisen.

Die Bedeutung thromboplastischer Wirkungen energisch betont zu haben, ist *Nolfs* Verdienst. Indessen kannte man solche Wirkungen schon früher: *Bordet* und *Gengou*[3]) fingen Blut in paraffinierten Gefäßen auf,

[1]) *Wooldridge*, Die Gerinnung des Blutes. Deutsch von *M. v. Frey*. Leipzig 1891

[2]) *Nolf*, Contribution à l'étude de la coagulation du sang. 3e mémoire. Arch internat. de Physiol. VI. H. 1 (1908).

[3]) *Bordet-Gengou*, Recherches sur la coagulation du sang. Ann. Instit. *Pasteur*. Bd. 17. S. 822. (1903).

entfernten die zelligen Elemente durch die Zentrifuge und gewannen ein völlig zellfreies Plasma. Dieses blieb flüssig, so lange es in paraffinierten Gefäßen verweilte. Füllte man es aber in ein Glasgefäß mit benetzbaren Wänden, so erfolgte schon in kurzem Gerinnung. Hier hatte also das Plasma sicher schon alles zur Gerinnung Notwendige enthalten. Aber die gerinnungserzeugenden Substanzen konnten erst dann miteinander reagieren, als durch Einführung einer benetzbaren Fläche ein thromboplastisch wirkender Faktor gegeben war.

In dieselbe Kategorie gehören auch vermutlich einige Beobachtungen am „Peptonplasma“: dieses gerinnt spontan gar nicht oder doch nur sehr langsam. Dagegen läßt es sich meist durch Verdünnen mit destillierten Wasser oder durch leichtes Ansäuern zur Gerinnung bringen.

Zu wesentlich anderen Vorstellungen als die übrigen Beobachter ist *Leo Loeb*[1]) gekommen. Er ging von der Untersuchung der Blutgerinnung bei Wirbellosen aus, bei denen die Verhältnisse viel einfacher liegen. Bei vielen Wirbellosen beobachtet man überhaupt keine eigentliche Gerinnung sensu strictiori. Die Blutstillung geschieht lediglich durch Agglutination der amöboiden Zellen des Blutes, die sich zusammenballen, verfilzen und hierdurch einen Verschluß des blutenden Gefäßes bewirken. (Übrigens läßt sich ein analoger Vorgang auch bei Wirbeltieren überall nachweisen. Kurz vor der Gerinnung tritt eine auch schon makroskopisch sichtbare Agglutination von Leukozyten und Blutplättchen ein.) Meist beschränkt sich bei Wirbellosen der Gerinnungsvorgang auf diese Agglutination. Ein fibrinogenähnlicher Eiweißkörper existiert nicht. Einige Dekapoden zeigen aber Verhältnisse, die der Wirbeltiergerinnung an die Seite zu stellen sind. Es tritt bei ihnen nämlich eine Art von zweiter Gerinnung ein, die durch Unlöslichwerden eines Fibrinogens entsteht. Zwei Gruppen von Substanzen veranlassen diese zweite Gerinnung: erstens das Thrombin und zweitens in den Geweben enthaltene Koaguline. *Loeb* ist nicht der Ansicht, daß die Koaguline als Kinasen wirken, er denkt daran, daß sie auch bei Wirbeltieren direkt am Fibrinogen angreifen. Die Gewebskoaguline würden also prinzipiell ähnlich wirken wie Thrombin. Immerhin darf man beide Körper nicht identifizieren, denn das Thrombin ist auch bei Abwesenheit von Ca-Salzen wirksam, es bedarf ihrer nur zu seiner Entstehung. Die Koaguline wirken dagegen nur bei Gegenwart von Ca-Ionen. Das Thrombin ist ferner in der Wirbeltierreihe nicht spezifisch adaptiert, die Gewebskoaguline zeigen ausgesprochene Spezifität. Verschiedenartige Substanzen besitzen also hiernach die Fähigkeit, Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln. Im übrigen hebt *Loeb* mit Recht hervor, daß heute jeder Theorie der Blutgerinnung bei der außerordentlichen Komplikation der Erscheinungen und der Unmöglichkeit, mit reinen Körpern zu arbeiten, eine gewisse Unsicherheit anhaften muß.

[1]) *L. Loeb*, siehe die zusammenfassende Darstellung im Biochemischen Zentralbl. VI, S. A. (1907).

Endlich mag noch bemerkt werden, daß neuerdings *Howell*[1]) und *Rettger*[2]) den gerinnungsbefördernden Substanzen der Zellen und Gewebe überhaupt jede größere Bedeutung für die Entstehung des Thrombins absprechen. Zusatz von Gewebsextrakten soll nicht anders wirken, als der irgend welcher indifferenter Substanzen mit großer Oberfläche (Kohle, Glaspulver etc.). Wie sich hiermit die von *Loeb* u. a. nachgewiesene Spezifität der Extrakte in Einklang bringen läßt, scheint mir unverständlich. Es gehen also die Anschauungen noch recht weit auseinander. Zum Verständnis der hier gegebenen methodologischen Darstellung mag aber Folgendes betont werden: Ein hoher Grad von Wahrscheinlichkeit spricht dafür, daß das Thrombin durch Zusammenwirken mindestens dreier Faktoren entsteht. Zwei, nämlich Thrombogen und Kalksalze, finden sich sicher schon im zirkulierenden Plasma, die Thrombokinase (oder das Thrombozym *Nolfs*) wird wohl vorwiegend erst extravaskulär von den geformten Elementen an das Plasma abgegeben. Verschiedene Einflüsse, besonders Berührung mit Fremdkörpern, sind im Stande, die Entstehung des Thrombins zu beschleunigen. Diese Erscheinung wird nur zum Teil dadurch erklärt, daß die Zellen bei ausgedehnter Bezeichnung mit Fremdkörpern schneller zerfallen, respektive zur Abgabe der ihnen entstammenden gerinnungsbefördernden Stoffe veranlaßt werden. Sicher ist der Einfluß der Berührung mit Fremdkörpern auch noch ein anderer: nach Erfahrungen von *Bordet-Gengou* und *Nolf* befördert sie auch die Gerinnung des zellfreien Plasma.

Sehr wenig ist über die zweite Phase der Gerinnung, die Überführung des Fibrinogens in Fibrin, bekannt. Möglicherweise handelt es sich um eine Spaltung des Fibrinogenmoleküls, wie *Heubner*[3]) vermutet. Das Fibrinogen soll dabei in Fibrin und das von *Hammarsten*[4]) entdeckte Fibringlobulin gespalten werden. Letzteres ist löslich und im Serum nach vollendeter Gerinnung nachweisbar. Nach *Huiskamp*[5]) ist es aber gar nicht erforderlich, das Fibringlobulin als eine für die Gerinnung wichtige Substanz anzusehen. Denn es gelingt durch Fällung mit Fluornatrium Fibrinogenlösungen zu erhalten, die frei von Fibringlobulin sind. Dieses entsteht daher wahrscheinlich nicht erst während der Gerinnung, sondern ist schon von vorneherein in den Fibrinogenlösungen enthalten, entweder als einfache Beimengung oder in lockerer Verbindung mit dem Fibrinogen.

Kurz nach vollendeter Gerinnung beginnt der Blutkuchen sich zusammenzuziehen und läßt Serum austreten. Für diese Retraktion des

[1]) *Howell*, The coagulation of blood. The Cleveland medic. Journ. Januar und Februar (1910). S. A.

[2]) *Rettger*, The coagulation of blood. Americ. Journ. of Physiol. Vol. 24. p. 406 (1909). S. A.

[3]) *Heubner*, Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. Arch. f. exper. Pathol. Bd. 49. S. 229 (1903).

[4]) *Hammarsten*, Über das Fibrinogen. *Pflügers* Arch. Bd. 22. S. 502 (1880).

[5]) *Huiskamp*, Zur Fibringlobulinfrage. Zeitschr. physiol. Chemie. Bd. 44 (1905) S. A. und Bd. 46 (1905). S. A.

Blutkuchens sind nach *Le Sourd* und *Pagniez*[1], *Arthus* und *Chapiros*[2] u. a. die Blutplättchen maßgebend. Das Fibrin ist zwar selbst elastisch, indessen fehlt die Retraktion stets im zellfreien Plasma. Die Elastizität des Fibrins allein reicht also nicht aus. Ebenso soll die Retraktion bei manchen Krankheiten (hämorrhagischen Diathesen) aufgehoben sein.

Fibrinolyse. Bisweilen, allerdings nicht gerade häufig, beobachtet man eine Auflösung des Fibringerinnsels nach vollendeter Gerinnung. Hier dürfte ein eiweißverdauendes Ferment im Spiele sein, das nach *Rulot*[3] u. a. wohl den Leukozyten entstammt. Besonders intensiv ist die Fibrinolyse bei experimenteller Phosphorvergiftung, nach gewissen Leberschädigungen (*Doyon*[4], *Nolf*[5]) und im Leichenblute (*Morawitz*[6], *Wohlgemuth*[7]). Starke Fibrinolyse kann Fehler in der Deutung von Gerinnungsversuchen veranlassen.

B. Allgemeiner Gang einer Untersuchung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes.

Zunächst ist die Gerinnungszeit mit einer der weiter unten beschriebenen Methoden festzustellen. Finden sich irgend welche Abweichungen von der Norm, so hat man zu untersuchen, ob dafür das Substrat der Gerinnung, das Fibrinogen, oder das Thrombin verantwortlich ist. Setzt man zu dem gar nicht oder doch nur sehr langsam gerinnenden Blute eine Fibrinogenlösung und erweist sich diese schon in kurzer Zeit geronnen, so liegt wahrscheinlich keine Störung in der Bildung des Thrombins vor. Die Ursache der Gerinnungshemmung ist vielmehr in Änderungen des Gerinnungssubstrates, scil. des Fibrinogens, zu suchen. Man wird dann prüfen müssen, ob sich in dem mangelhaft gerinnenden oder ganz ungerinnbaren Blute überhaupt noch Fibrinogen nachweisen läßt. Das geschieht z. B. durch Zusatz von Ammonsulfat nach der von *Reye*[8] (s. S. 271) beschriebenen Methode. Die Erfahrung spricht dafür, daß ein Fehlen des Fibrinogens nur in den allerseltensten Fällen als Ursache einer Gerinnungsstörung in Frage kommt.

Bleibt dagegen auch die dem Blute nachträglich zugesetzte Fibrinogenlösung ungeronnen oder gerinnt sie nur langsam, so müssen Störungen in

---

[1]) *Le Sourd* et *Pagniez*, Recherches sur le rôle des plaquettes sanguines etc. Journ. de Physiol. et de Pathol. génér. 15 janvier 1909. T. **11**. p. 1—11.

[2]) *Arthus* et *Chapiros*, Études sur la rétraction du caillot sanguin. Arch. internat. de Physiol. Mai 1908. Fasc. III. p. 298.

[3]) *Rulot*, Intervention des Leucocytes dans l'autolyse de la fibrine. Arch. internat. de Physiol. T. **1** (1904). fasc. II et III.

[4]) *Doyon*, Zahlreiche Beitr. in den Compt. rend. soc. Biol. Bd. 58 (1905).

[5]) *Nolf*, Les modifications de la coagulation du sang chez le chien après exstirpation du foie. Arch. intern. de Physiol. T. **3** (1905/06).

[6]) *Morawitz*, Über einige postmortale Blutveränderungen. *Hofmeisters* Beiträge Bd. **8** (1906). S. 1.

[7]) *Wohlgemuth*, Pathologische Fermentwirkungen. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 48 und 49 (1910).

[8]) *Reye*, Über Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. I.-D. Straßburg 1898.

der Bildung und Wirkung des Thrombins vorliegen. Diese sind dann im einzelnen zu analysieren. Hier kommt Folgendes in Betracht: Ungenügende Menge des Thrombogens im zirkulierenden Plasma, Mangel an ionisierten Kalksalzen, ferner unzureichende Bildung, respektive Abgabe von Thrombokinase (Thrombozym von *Nolf*) seitens der geformten Elemente. Endlich können auch Antikörperwirkungen hemmend eintreten.

Sehr einfach gestaltet sich der Nachweis einer unzureichenden Konzentration der Ca-Ionen. Zusatz mäßiger Mengen ionisierter Kalksalze muß dann die Gerinnung beschleunigen respektive ermöglichen. Im anderen Falle ist er wirkungslos. Bisher ist noch nichts Sicheres darüber bekannt, ob Mangel an Kalksalzen überhaupt in der Pathologie irgendwo eine Rolle als gerinnungshemmender Faktor spielt. Viel häufiger liegt die Ursache mangelhafter Gerinnung in Störungen der Entstehung respektive Wirkung der Thrombokinase (z. B. bei der Hämophilie, bei hämorrhagischen Diathesen Leberkranker etc.). Der Nachweis gelingt leicht: Zusatz von Thrombokinase muß in solchen Fällen prompte Gerinnung zur Folge haben. Nur sehr selten scheint Mangel an Thrombogen vorzuliegen, z. B. bei experimenteller Phosphorvergiftung. Dann wird weder Zusatz von Thrombokinase noch von Kalksalzen imstande sein, die Gerinnungshemmung zu überwinden; wohl kann aber das betreffende Blut noch auf Zusatz fertigen Fibrinferments, also z. B. auf Serumzusatz, gerinnen. Endlich wäre noch die Frage der Gerinnungshemmung durch „Antithrombine" zu erörtern. Man prüft auf diese, indem man zu der zu untersuchenden Flüssigkeit steigende Mengen von Thrombin, z. B. Blutserum, setzt. Beruht die Gerinnungshemmung teilweise oder ausschließlich auf der Anwesenheit solcher Antithrombine, so werden kleine Fermentmengen wirkungslos bleiben, größere dagegen Gerinnung bewirken. Am einfachsten lassen sich diese Verhältnisse am Hirudin, der gerinnungshemmenden Substanz des Blutegels, studieren. Wahrscheinlich kommen gerinnungshemmende Körper auch schon im normalen Blutplasma vor.

II. Methoden zur Bestimmung der Gerinnungszeit.

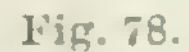
A. Allgemeines und Fehlerquellen.

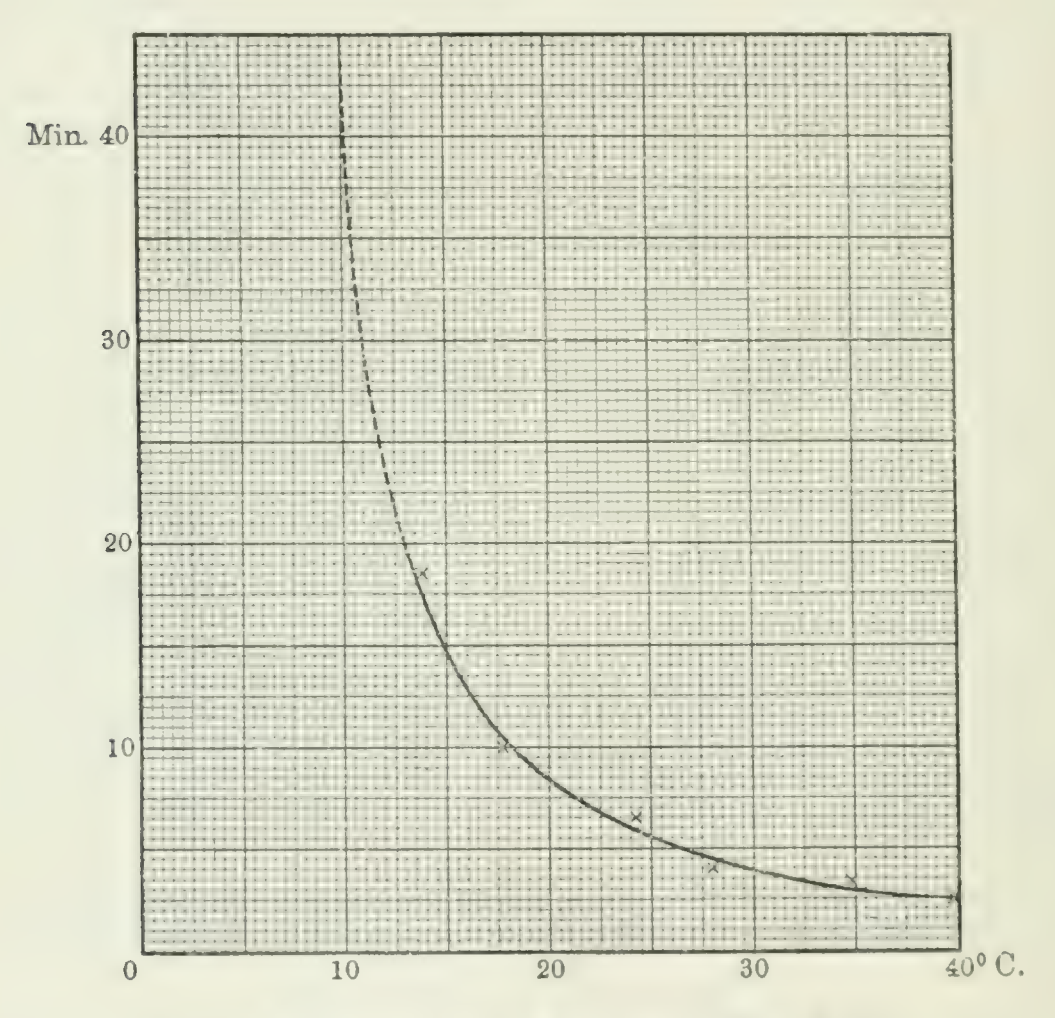
Unter Gerinnungszeit versteht man den Zeitraum, den Blut außerhalb der Gefäße bis zum Festwerden braucht. Die Gerinnungszeit ist keine feststehende Größe. Sie ist von zahlreichen, zum Teil wohlbekannten Faktoren abhängig. Nur wenn man diese stets gleichmäßig zu gestalten vermag, darf man auf vergleichbare Werte rechnen. Gerinnungsbestimmungen, die mit verschiedenen Methoden ausgeführt worden sind, können miteinander nicht in Beziehung gebracht werden.

Folgende Momente beeinflussen die Gerinnungszeit:

1. Berührung mit benetzbaren Fremdkörpern kürzt die Gerinnungszeit um so mehr ab, je größer die Berührungsfläche ist. Eine größere Blutmenge wird daher in einem Glasgefäße längere Zeit zur Ge-

rinnung brauchen als eine kleinere, bei der die mit den Glaswänden in Berührung tretende Oberfläche verhältnismäßig groß ist. Aus demselben Grunde beschleunigen Verunreinigungen und Rauhigkeiten der Oberfläche des Glases den Gerinnungsablauf. Zu Gerinnungsbestimmungen müssen daher stets gleichgroße Blutmengen Verwendung finden, außerdem Glasgefäße von gleicher Größe, die vor Gebrauch sorgfältig (Wasser, Alkohol, Äther) zu säubern und vor Verstaubung zu schützen sind.


Fig. 78.



Einfluß der Temperatur auf die Gerinnungszeit. (Nach *Bürker*.)

2. Änderungen der Temperatur sind von großem Einfluß auf die Gerinnungszeit. Die nebenstehende Kurve illustriert deutlich dieses Verhalten (Fig. 78).

Gerade im Bereich der sogenannten Zimmertemperatur (15—20°) sind Abweichungen von wenigen Graden sehr bedeutungsvoll, wie die Kurve *Bürkers*[1]) zeigt. Dasselbe ergibt sich auch aus den mit anderer

[1]) *Bürker*, Ein Apparat zur Ermittlung der Blutgerinnungszeit. *Pflügers* Arch. Bd. 118. S. 452 (1907).

Methodik ausgeführten Versuchen von *Kottmann*.[1]) Danach betrug die Gerinnungszeit normalen menschlichen Blutes bei 40° zirka 6', bei 20° mehr als 20'. Temperaturkonstanz ist also absolut erforderlich. Methoden, die hierauf keine Rücksicht nehmen, bieten grobe Fehlerquellen.

3. Ausgedehntere Berührung mit Geweben (z. B. der Wundfläche) und Blutgerinnseln kürzt die Gerinnungszeit ab. Wahrscheinlich beruht das zum Teil auf Abgabe von Thrombokinase, respektive zymoplastischer Substanzen von den zertrümmerten Geweben an das Blut. Vielleicht werden auch die Blutzellen selbst beeinflußt. Fertiges Thrombin, wie es sich z. B. in Blutgerinnseln findet, verkürzt ebenfalls die Gerinnungszeit, und zwar viel stärker, als man das nach Maßgabe des geringen Gehaltes der Gerinnsel an Fibrinferment erwarten sollte. *Bordet* und *Gengou*[2]) nehmen an, daß zugesetztes Fibrinferment durch einen Vorgang, der mit bekannten autokatalytischen Prozessen in Parallele gesetzt werden kann, die schnelle Bildung großer Fermentmengen im Blute auslöst. Ob diese Erklärung zutreffend ist, steht noch dahin. Die starke Verkürzung der Gerinnungszeit nach Zusatz von Blutgerinnseln ist aber unbestreitbar.

Für praktische, respektive methodische Zwecke ergibt sich hieraus: Man soll Blut zum Zwecke einer Bestimmung der Gerinnungszeit möglichst so entnehmen, daß keine Berührung mit Geweben stattfindet, d. h. also durch Venenpunktion. Falls aber das, wie so häufig beim Menschen, nicht tunlich sein sollte, muß man stets die Tiefe des Einstiches in die Haut möglichst gleichmäßig bemessen, auch jedes Pressen und jeden Druck in der Umgebung der Wundränder vermeiden, um nicht durch Beimengung von Gewebsflüssigkeit ganz unkontrollierbare Verhältnisse zu schaffen. Endlich hat man dafür zu sorgen, daß die Blutstropfen der Wunde schnell entquellen.

Wunden, in denen sich bereits Gerinnsel gebildet haben, sollen nicht noch einmal zur Blutentnahme für Gerinnungsbestimmungen benutzt werden; denn die Blutstropfen, die man dann erhält, gerinnen meist sehr rasch. Dieselbe Vorsichtsmaßregel sollte auch im Tierversuch beobachtet werden. Hat man in irgend ein Blutgefäß eine Kanüle eingebunden, so sollte man diese nur einmal, nicht aber mehrfach zur Blutentnahme benutzen, besonders wenn zwischen der ersten und zweiten Entnahme längere Zeit verstrichen ist. Sonst wird man oft bei der zweiten Blutentnahme — selbst wenn man die Kanüle inzwischen mit Kochsalzlösung ausgespritzt hat — eine starke Beschleunigung der Gerinnung feststellen können, die rein lokal bedingt ist und mit einer allgemeinen Änderung der Gerinnbarkeit gar nichts zu tun hat. Manche Versuche, besonders die älteren Beobachtungen über die gerinnungsbefördernde Wirkung der Gelatine,

[1]) *Kottmann*, Der Koaguloviskosimeter etc. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 69. S. 415 (1910).

[2]) *Bordet-Gengou*, Rech. sur la coagulation du sang. 4ème mém. Sur le pouvoir coagulant du sérum. Ann. de l'instit. *Pasteur*. T. 18 (1904). S. 98—115.

leiden an diesem Mangel der Methodik. Man tut daher gut, im Tierversuch die Blutentnahme an verschiedenen Stellen und stets mit ungebrauchten, sorgfältig gereinigten Kanülen auszuführen. Die durch Einbinden der Glaskanüle geschädigten Gefäßwandzellen können möglicherweise auch schon eine schnellere Blutgerinnung veranlassen.

4. Der Gasgehalt des Blutes ist nicht ohne Einfluß auf die Gerinnungszeit. Kohlensäurereiches Blut gerinnt nach *A. Schmidt* u. a. langsamer als CO_2-armes. Auch das verdient Beachtung. Ein wechselnder Gasgehalt des Blutes kommt als Fehlerquelle besonders für die Methoden in Betracht, die mit gestautem Armvenenblut arbeiten. Wie groß die praktische Bedeutung der vermehrten CO_2-Spannung ist, scheint noch nicht genauer untersucht zu sein. Jedenfalls geht *Deetjen*[1]) zu weit, wenn er eine wesentliche Ursache der Gerinnung des Blutes in einer Abnahme seiner CO_2-Spannung (bedingt durch Entweichen von CO_2 in die Atmosphäre) erblickt.

Werden alle diese Fehlerquellen berücksichtigt, arbeitet man stets mit gleicher Methodik, so findet man eine ziemlich weitgehende Konstanz der Gerinnungszeit. Das gilt für ein und dasselbe Individuum, aber auch für verschiedene Individuen derselben Spezies. Ein Einfluß von Tageszeit und Nahrungsaufnahme ist nicht deutlich zu erkennen. *Bürker*[2]) nimmt ein Minimum der Gerinnungszeit gegen 2 Uhr nachmittags an. Andere (*Addis*[3]), *Hartmann*[4]) fanden keine Gesetzmäßigkeit nach dieser Richtung.

Da die meisten Methoden zur Bestimmung der Gerinnungszeit nicht ganz einfach sind, sollte man sich erst dann an die Untersuchung wissenschaftlicher Fragen machen, wenn man am Normalen zuverlässige Werte zu gewinnen vermag.

Eine praktisch bedeutsame Frage bleibt noch zu erörtern: Gibt die Bestimmung der Gerinnungszeit in vitro wirklich ein zuverlässiges Bild von den Vorgängen, die sich beim Verschluß blutender Wunden im Organismus abspielen? Liegen dort nicht vielleicht ganz andere Verhältnisse vor, die eine Übertragung der bei Versuchen in vitro gewonnenen Vorstellungen gar nicht gestatten?

Wahrscheinlich sind nun allerdings die Vorgänge beim Verschluß blutender Gefäße der Gerinnung in vitro nicht ohne weiteres an die Seite zu setzen. Im ersten Falle spielt sicher die Agglutination der Blutplättchen und Leukocyten und die dadurch bedingte Pfropfbildung eine vielleicht ebenso bedeutende Rolle, wie die eigentliche Fibringerinnung. Trotzdem zeigen doch fast alle Individuen, die schwer stillbaren Blutungen unterworfen sind, die Erscheinung einer verminderten Gerinnbarkeit in vitro.

---

[1]) *Deetjen*, Zerfall und Leben der Blutplättchen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **63**. Heft 1 (1909).

[2]) *Bürker*, l. c.

[3]) *Addis*, The coagulation Time of the blood etc. Edinb. med. Journ. July 1910. S. A.

[4]) *Hartmann*, Zur Frage der Blutgerinnungszeit. Münchener med. Wochenschr. Nr. 16 (1909).

Insofern besteht also ein Zusammenhang. Dagegen darf man den Satz nicht umkehren: Eine verzögerte Gerinnung braucht nicht notwendigerweise mit einer starken Neigung zu Blutungen einherzugehen (*Hinman* und *Sladen*[1]).

Im Folgenden können nicht alle Methoden zur Bestimmung der Gerinnungszeit beschrieben werden. Ihre Zahl ist Legion. Ich beschränke mich auf die Verfahren, deren Brauchbarkeit durch zuverlässige Beobachtung feststeht.

B. Methoden zur Bestimmung der Gerinnungszeit.

1. Methode von *Vierordt.*[2]) Sie ist das älteste aller brauchbaren Verfahren zur Bestimmung der Gerinnungszeit. Auch heute noch findet sie hier und da Verwendung.

Vierordt saugt Blut in sorgfältig gereinigte und getrocknete, beiderseits offene kapillare Glasröhren von 1 *mm* Durchmesser und 5 *cm* Länge. Ein durch Einstich in die Haut gewonnener Blutstropfen wird mit dem Ende einer der Glasröhren berührt. Das Blut tritt sofort durch Kapillarattraktion in das Glasröhrchen ein. Man sorgt dafür, daß die Blutsäule stets gleich lang ausfällt, etwa 5 *mm*. In die Röhre wird nun von der anderen Seite ein weißes, durch Alkohol und Äther entfettetes und getrocknetes Pferdehaar eingeführt. Die Länge des Haares beträgt 10 *cm*. Es wird durch die Blutsäule hindurchgeführt und von Zeit zu Zeit, etwa alle $^1/_2$ Minute, um ein kleines Stück weiter vorgezogen. So lange das Blut noch nicht geronnen ist, bleiben die durch das Blut durchgeführten Partien des Haares ungefärbt. Mit Beginn der Gerinnung bedeckt sich das Haar mit rötlichen Niederschlägen. Das Ende der Koagulation wird dadurch bezeichnet, daß keine neuen Niederschläge entstehen und das Haar bei weiterem Vorziehen wieder weiß erscheint.

Als Gerinnungszeit gilt der Zeitraum vom Einströmen des Blutes in die Glasröhre bis zur Vollendung der Fibrinabscheidung. Er beträgt nach *Vierordt* bei einem gesunden Menschen im Durchschnitt $9^1/_4{}'$, mit Schwankungen von 7 bis 11′ (Zimmertemperatur). Diese Zeit ist recht lang, wenn man die ausgedehnte Berührung des Blutes mit der Glaswand berücksichtigt. *Vierordt* sucht nicht den Beginn, sondern das Ende der Gerinnung zu bestimmen. Bestimmung des Gerinnungsbeginnes soll weniger exakt sein.

Nach *Sahli*[3]) kann man mit *Vierordts* Methode, auch in ursprünglicher Gestalt, brauchbare Resultate erhalten. Doch sind verschiedene Fehlermöglichkeiten zu berücksichtigen, z. B. Temperaturschwankungen.

[1]) *Hinman* und *Sladen*, Measurement of the Coagulatio Time of the blood, and its Application. *Johns Hopkins* Hosp. Bull. Vol. 18. Juni-Juli 1907. S. A.

[2]) *Vierordt*, Arch. f. Heilkunde. Bd. 19 (1878), zitiert nach *Kottmann* und *Lidsky*. Vergl. Zitat S. 226.

[3]) *Sahli*, Über das Wesen der Hämophilie. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 56. S. 264 (1905).

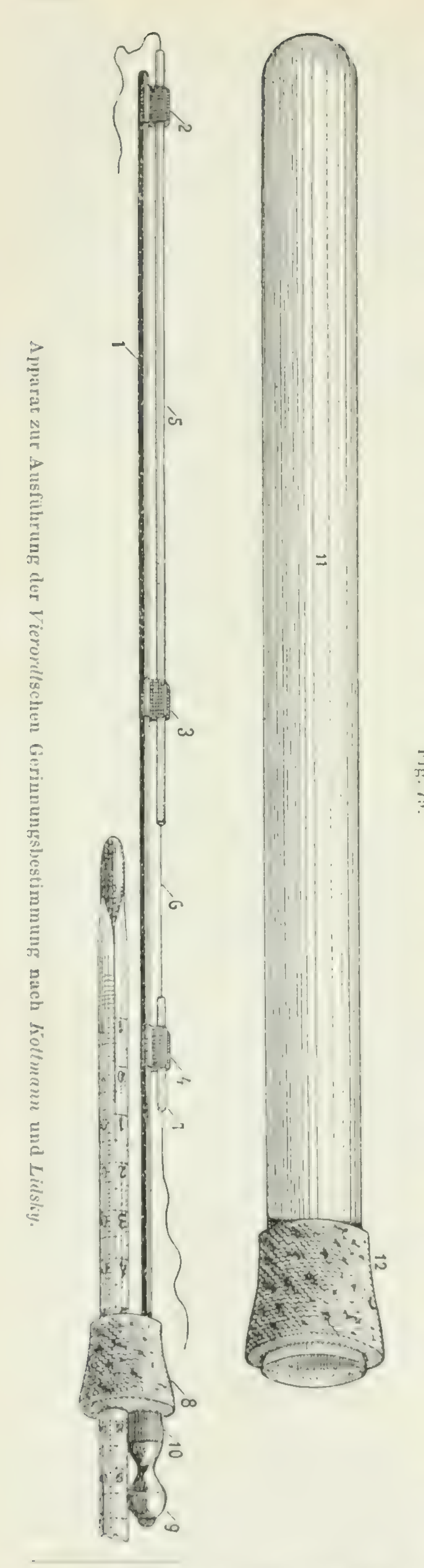


Fig. 79. Apparat zur Ausführung der *Vierordt*schen Gerinnungsbestimmung nach *Kottmann* und *Lidsky*.

Man muß daher stets an einer normalen Person Kontrollbestimmungen vornehmen, und zwar unter gleichen Temperaturbedingungen. Tiefe Einstiche in die Haut sind ebenfalls nötig. Tropfen auf Tropfen soll in schneller Folge aus der Wunde quellen. Man vermeide Druck und Pressen der Wundränder. Die Reinigung der Haut (Alkohol, Äther) geschehe stets gleichmäßig.

Modifikation der *Vierordt*schen Methode durch *Kottmann* und *Lidsky*.[1])

Die Verbesserung betrifft in der Hauptsache Herstellung konstanter Temperaturverhältnisse. Der ganze Apparat wird in eine Thermosflasche versenkt (Fig. 79).

Die Glasröhre *11* ist mit Hilfe des Korkstopfens *12* in eine mit Wasser von beliebiger Temperatur gefüllte, horizontal gelagerte Thermosflasche versenkt. In den temperierten Luftmantel der Glasröhre wird der armierte Metallstab *1* eingeschoben und das Luftsystem durch den Kork *8* abgeschlossen. Vorher hat man die durch die Klammer *4* an den Metallstab befestigte Kapillare *7* in der von *Vierordt* beschriebenen Weise mit Blut gefüllt. *6* ist das in der oben beschriebenen Art präparierte Pferdehaar. Es wird von Zeit zu Zeit um ein kleines Stück durch die Blutsäule vorgeschoben. Alle halbe Minute kontrolliert man den Ablauf der Gerinnung dadurch, daß man durch Vorziehen des Eisenstabes sich den mit *7* bezeichneten Punkt des Pferdehaares sichtbar macht. Die durch den Zapfen *10* verschlossene weitere Öffnung im Kork *8* dient dazu, die Kapillare durchzuziehen und sichtbar zu machen. Die Besichtigung soll immer nur möglichst kurze Zeit in Anspruch nehmen. Der Zapfen *10* muß beim Zurückschieben die Öffnung in Kork *8* wieder gut verschließen. Die Kapillare *5* dient nur zur leichten Führung des Pferdehaares. Dieses wird sofort nach Füllung der Kapillare *4*

[1]) *Kottmann-Lidsky*, Die *Vierordt*sche Methode für Gerinnungsbestimmungen etc. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **69**. S. 431 (1910).

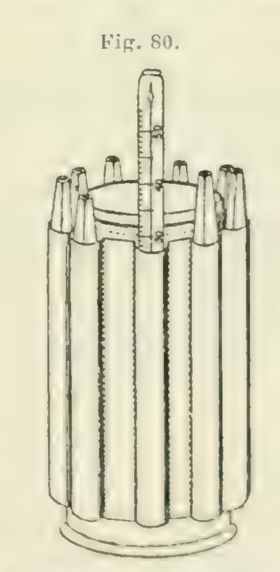
mit Blut durch die Blutsäule hindurchgeführt. Ein durch Kork *S* gestecktes Thermometer gibt die im Luftmantel herrschende Temperatur an.

Bisher haben nur *Kottmann* und *Lidsky* (l. c.) mit diesem Verfahren gearbeitet. Der Vorteil dieser Methode der *Vierordt*schen gegenüber liegt darin, daß man nicht gezwungen ist, jedesmal an normalen Personen Kontrolluntersuchungen unter gleichen äußeren Bedingungen (Temperatur!) anzustellen. Beginn und Ende der Gerinnung lassen sich mit hinreichender Genauigkeit bestimmen. Die beiden Werte liegen nach *Kottmann* nicht sehr weit auseinander.

2. Methode von *Wright.*[1]) Auch diese beruht auf der Bestimmung der Gerinnungszeit in Glaskapillaren. *Wright* hat sein Verfahren mehrfach abgeändert und verbessert. In England und Amerika ist es viel in Gebrauch. Das Prinzip ist folgendes: Eine größere Reihe genau gleicher Glasröhren wird mit Blut gefüllt und nach einer bestimmten Zeit ausgeblasen. Die Blutproben werden nach *Wright* als „flüssig", „gerinnend" und „geronnen" bezeichnet. Geronnen ist das Blut dann, wenn die Kapillare nicht mehr ausgeblasen werden kann. Findet sich beim Ausblasen auf Filtrierpapier ein kleines Fibrinfädchen, so ist das Blut nicht mehr flüssig, sondern gerinnend.

Das ursprüngliche *Wright*sche Verfahren gestaltete sich im einzelnen folgendermaßen: Ein halbes bis ein Dutzend Glaskapillaren von 0·25 *mm* Durchmesser werden so graduiert, daß sie eine Blutsäule von 5 *cm* Länge aufzunehmen vermögen. Ein durch Einstich in die Fingerbeere gewonnener Blutstropfen wird mit einer der Glasröhren aufgesogen. Nach Füllung des Röhrchens notiert man die Zeit der Blutentnahme. Dann wird die Wunde abgewischt und ein neuer Blutstropfen in einem zweiten Glasröhrchen aufgefangen usw. Die Füllung immer neuer Kapillaren geschieht in Zwischenräumen von $^1/_4$ bis $^1/_2$', ebenso auch später das Ausblasen des Blutes. Pressen der Wundränder zum Zwecke eines besseren Blutzuflusses ist verboten.

Fig. 80.



Koagulometer von Wright. (Aus B[illegible], Traité d'Hématologie. Paris 1904.)

Zur Herstellung konstanter Temperaturbedingungen empfiehlt *Wright* sein Koagulometer. Es ist das ein mit Wasser von bestimmter Temperatur gefüllter Metallzylinder, der von einer eng anliegenden Flanelltasche umgeben ist. In diese Tasche werden die Glasröhrchen nebst einem Thermometer schon vor Beginn des Versuches eingeschoben und vorgewärmt. Am besten füllt man den Metallzylinder mit Wasser von 18·5°. Bei dieser Temperatur wird eine im Laufe des Versuches eintretende Abkühlung des Wassers keine nennenswerte Fehlerquelle abgeben können (Fig. 80).

[1]) *Wright*, An a method of determining the condition of blood coagulability etc. Brit. med. Journ. II. p. 223 (1893). — Derselbe, On some new procedures for the examination of the blood etc. Lancet. London 1902. II. S. M.

Wright nahm dann noch weitere Modifikationen vor. Die eine betrifft die Herstellung der Glaskapillaren von dem erwünschten Durchmesser. Die Methode ist einfach und elegant: Ein Glasrohr wird in eine Kapillare ausgezogen und mit 5 *mm*³ Quecksilber geeicht. Man wird beim Verschieben des Quecksilberfadens eine Stelle finden, in der die Quecksilbersäule in der Glaskapillare gerade eine Länge von 5 *cm* hat. Die obere und untere Grenze dieser Partie wird markiert und die Kapillare in der Weise abgeschnitten, daß das eine ihrer Enden mit einer der Marken zusammenfällt, das andere sich etwa 1—2 *cm* über der anderen Marke befindet. In dieser Weise stellt man sich eine größere Zahl Kapillaren her, die man beim Versuch bis zur oberen Marke mit Blut füllt.

In letzter Zeit hat *Wright* Temperaturkonstanz nicht mehr mit Hilfe des Koagulometers, sondern durch ein Wasserbad von 18·5° hergestellt. Die einzelnen Kapillaren werden aufrecht hineingestellt, das obere Ende überragt den Wasserspiegel. Eine Mischung von Wasser und Blut wird durch die zwischen Wasser und Blut eingeschlossene Luftsäule verhindert. Will man die Kapillaren in Wasser vorwärmen, so muß man ihr unteres Ende durch eine Gummikappe verschließen.

Die *Wright*sche Methode dürfte manchen anderen, besonders neueren Verfahren gegenüber kaum Vorteile bieten. Da das Lumen der Kapillaren nur 0·25 *mm* weit ist, sind die Gerinnungszeiten sehr kurz. Bei 37° ist die Gerinnungszeit z. B. normalerweise weniger als 2'. Das ist nicht erwünscht, da Differenzen im allgemeinen um so besser zum Ausdrucke kommen und um so sicherer sind, je länger die normale Gerinnungszeit ist. Außerdem ist es nicht ganz einfach, die für die Füllung so vieler Kapillaren nötigen Blutmengen zu bekommen. *Wright* empfiehlt im Notfalle zahlreiche Stiche oberhalb des Nagelbettes anzulegen. Dadurch vermeidet er allerdings den Fehler, den eine beginnende Gerinnung in der Wunde mit sich bringt; aber die Methode wird für den Untersuchten recht lästig.

3. Andere Kapillarmethoden.

a) Methode von *Sabrazès*.[1]) Das in großen Tropfen aus dem vorher mit Alkohol gereinigten und getrockneten Ohrläppchen hervorquellende Blut wird in Glaskapillaren aufgesogen. Diese sollen einen Durchmesser von 1 *mm* bei einer Länge von 10 *cm* haben. Sie bestehen aus möglichst dünnem Glase und werden sorgfältig mit Salzsäure, Soda, Wasser, Alkohol, Äther gereinigt und trocken unter aseptischen Kautelen, vor Staub geschützt, aufbewahrt. Es ist nach *Sabrazès* ziemlich schwierig, stets Kapillaren von genau 1 *mm* Durchmesser zu beschaffen. Kleinere Abweichungen (von $^8/_{10}$—$^{12}/_{10}$ *mm*) sollen aber das Resultat nicht wesentlich trüben. Eventuell könnte man sich auch des oben (S. 238) erwähnten Verfahrens von *Wright* zur Herstellung gleichmäßiger Glaskapillaren bedienen.

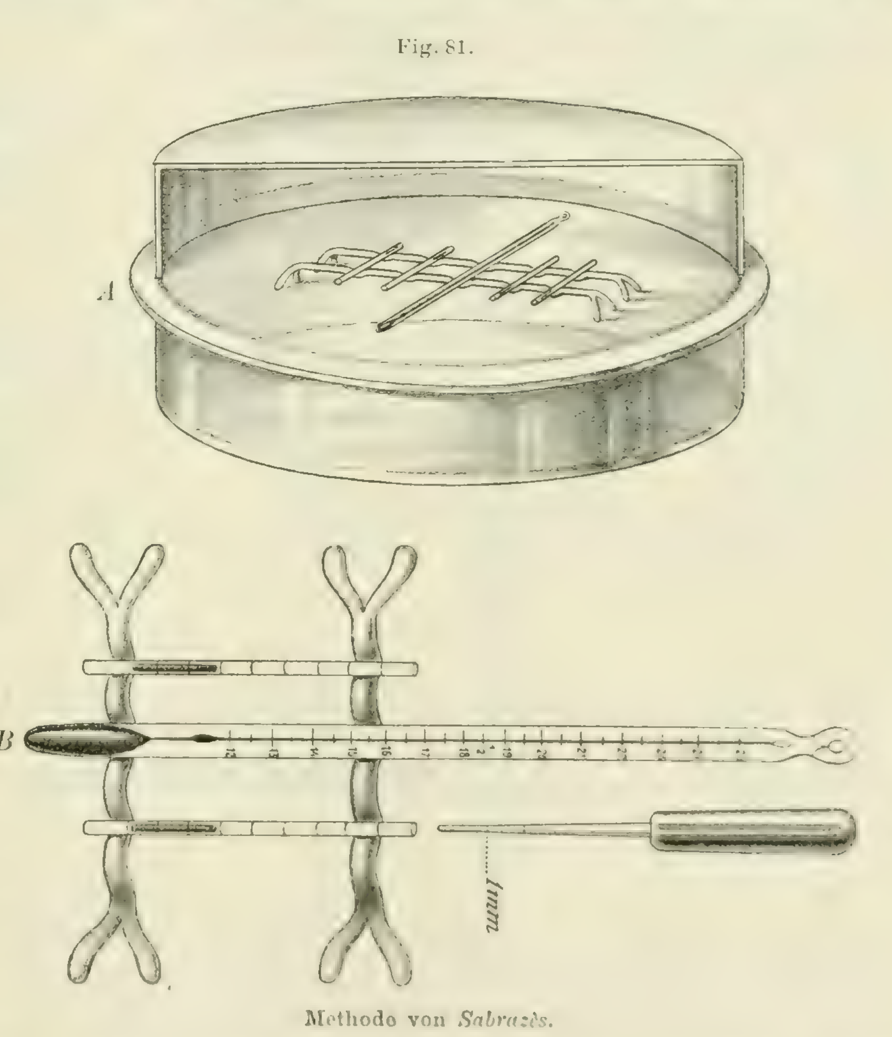
---

[1]) *Sabrazès*, Procédé de détermination du début de la coagulation du sang. Fol. haematol. III. p. 432 (1906).

Vor Beginn des Versuches werden die Kapillaren an mehreren Stellen mit der Feile eingeschnitten, um das später nötige Zerbrechen zu erleichtern.

Zur Herstellung konstanter Temperatur dient eine Glasglocke mit doppeltem Boden, der mit Wasser gefüllt wird. Man wählt die Temperatur des Wassers so, daß in der Kammer, respektive oberhalb des inneren Bodens, eine Temperatur von 18·5° herrscht. Im Sommer, bei hoher Zimmertemperatur, soll man einige Eisstücke statt Wasser zwischen den Doppelboden bringen (Fig. 81).

Fig. 81.



Methode von *Sabrazès*.

Zwei Kapillarrohre und das Thermometer liegen horizontal auf einem kleinen Gestell in der geschlossenen Kammer. Der Versuch kann begonnen werden, wenn sich das Thermometer auf 18·5° eingestellt hat. Dann wird der Einstich in das Ohrläppchen gemacht, der erste Tropfen fortgewischt, der zweite und dritte aspiriert und die Zeit der Füllung genau notiert. Die Kapillaren legt man dann sogleich mit der Pinzette an den alten Platz in der Kammer (Anfassen mit den Fingern soll möglichst vermieden werden). Die Glasglocke wird geschlossen. Jetzt hat der Beobachter vorwiegend die Temperaturkonstanz aufrecht zu erhalten (eventuell durch leichtes Anwärmen der Kammer, respektive kurzes Lüften der Glasglocke). Es soll leicht gelingen, die gewünschte Temperatur einige Minuten hindurch zu erhalten. Gleichzeitig überzeugt man sich durch vorsichtiges Neigen der Glaskammer mitsamt den horizontal gelagerten Kapillaren davon, daß sich die Blutsäule in ihnen noch gut verschiebt, entsprechend der Neigung gegen die Horizontale. Ist das nicht mehr der Fall, beginnt die Blutsäule scheinbar zu adhärieren, so nimmt man die zuerst gefüllte Glasröhre heraus und zerbricht sie an der vorher eingekerbten Stelle. Ein feines

Fibrinfädchen, das sich zwischen den Bruchenden ausspannt, zeigt die eingetretene Gerinnung an. Dann ist auch die andere Kapillare nahe am kritischen Punkte angelangt. Sobald eine deutliche Zunahme der Viskosität des Blutes beim Neigen der Kammer eintritt, wird auch das zweite Röhrchen zerbrochen. Sollte man das zu früh ausgeführt haben (kein Fibrinfädchen beim Bruche sichtbar), so wird der Versuch wiederholt. Dann ist aber die Gerinnungszeit schon durch den ersten Versuch approximativ festgelegt. Nach der Methode von *Sabrazès* beträgt sie für den Normalen zirka 9—10′. Das entspricht recht gut den von *Vierordt* mit gleichkalibrigen Kapillaren bestimmten Werten.

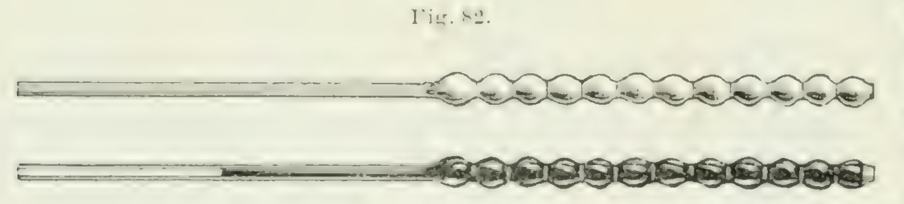
Mängel der *Sabrazès*schen Methode sind: Unbequeme Herstellung der konstant temperierten Kammer. Ungenügende Verschiebung der Blutsäule beim Neigen der Kapillare schon längere Zeit vor beginnender Gerinnung.

b) Methode von *Schultz*.[1]) Blut wird in einer Hohlperlenkapillare aufgefangen (Fig. 82).

Die einzelnen Glieder der Kapillare werden in bestimmten Zeitabschnitten abgebrochen und in abgemessenen Quanten physiologischer Kochsalzlösung ausgeschüttelt. Man kann hierdurch den Gerinnungsvorgang in Stadien zerlegen und sukzessive Fortgang und Abschluß der Gerinnung feststellen.

Die Gerinnungsröhre besteht aus einem Teilstück mit 12 eng aneinanderliegenden kugeligen Auftreibungen, die in einen kurzen Stiel auslaufen. Die Aufblasungen sollen möglichst kongruent sein, die Intervallstücke kurz und von dem ursprünglichen Durchmesser der Kapillare. Sind sie zu weit, so kann die Beobachtung dadurch gestört werden, daß bei Abbrechen einer Hohlperle Gerinnsel aus der nächsten Perle mit hinausgerissen werden. Man muß dann sofort noch eine Kugel abbrechen. Die Intervallstücke sind einseitig geritzt und werden der Markierung entsprechend gebrochen. Die Füllung eines Röhrchens erfordert ein bis zwei Tropfen Blut.

Fig. 82.



Methode von *Schultz*.

Der Gerinnungsversuch gestaltet sich folgendermaßen: Das Röhrchen ist sorgfältig mit Wasser, Alkohol und Äther gesäubert und getrocknet. Man läßt von seinem Ende, an dem sich die Perlen befinden, Blut eintreten, trocknet nach vollendeter Füllung etwa außen anhaftendes Blut ab und legt die Kapillare auf eine Unterlage, den Stiel etwas höher gerichtet, um ein Zurückfließen von Blut aus den Hohlperlen in den Stiel zu ver-

[1]) *Schultz*, Eine neue Methode zur Bestimmung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 12 (1910).

meiden. Inzwischen wird ein Reagenzglasgestell mit 12 oder 24 Reagenzgläsern aufgestellt und jedes Glas mit 1 *cm*³ physiologischer Kochsalzlösung beschickt. In gemessenen Zeitabständen bricht man nunmehr eine Hohlperle nach der anderen ab und wirft sie in das numerierte Glas. Man beobachtet dabei Entleerung und Aufschwemmung des Blutes in der Kochsalzlösung. Anfangs ist nichts von geronnenen Teilchen wahrnehmbar, in einem der folgenden Gläser zeigen sich dann zum ersten Male kleine Gerinnsel (Sp.). Ein größeres Gerinnsel, dessen Umfang kleiner als die Hälfte der Hohlperle ist, wird mit † bezeichnet. Als Endstadium ist der Punkt anzusehen, bei dem die Hohlperle ganz von Gerinnseln erfüllt ist und beim Schütteln nur geringe Mengen roter Blutscheiben in der Salzlösung aufgeschwemmt werden († † †).

Fehlermöglichkeiten liegen hauptsächlich in einer etwaigen ungleichmäßigen Qualität der Gerinnungsröhrchen.[1]) Für Temperaturkonstanz ist in irgend welcher Weise Sorge zu tragen. Berührung der Kapillare mit den Fingern müßte wohl vermieden werden, wenn man den Versuch bei einer niedrigeren Temperatur als 37° anstellt.

Durch Venenpunktion gewonnenes Blut gerinnt nach *Schultz* in 11—15′, Blut aus dem Ohrläppchen in 2—5′.

4. Methode von *Milian*[2]), verbessert von *Hinman* und *Sladen*[3]) (Objektträgermethode).

Milian läßt Blutstropfen auf eine Reihe sorgfältig gereinigter Objektträger fallen und notiert die Zeit des Einstiches sowie des Auffangens der einzelnen Tropfen. Die Gerinnung ist vollendet, wenn man den Objektträger senkrecht aufrichten kann, ohne Änderung der Konturen des Tropfenprofils. Im anderen Falle strömt das Blut natürlich an die tieferen Partien. Der Tropfen nimmt die Gestalt einer Träne an (Fig. 83).

Fig. 83.

A B

Methode von *Milian*. Konturen des Bluttropfens vor (*A*) und nach (*B*) der Gerinnung. (Aus *Hinman* und *Sladen*.)

Auf möglichst gleiche Temperaturverhältnisse ist Rücksicht zu nehmen. *Hinman* und *Sladen* empfehlen besonders auch die Größe der Tropfen zu beachten und ausschließlich solche von 4—6 *mm* Durchmesser zu ver-

[1]) Erhältlich bei der Firma Eberhardt vorm. Nippe, Berlin.

[2]) *Milian*, Technique pour l'étude clinique de la coagulation du sang. Soc. méd des hôp. Paris 1901.

[3]) *Hinman* und *Sladen*, l. c.

wenden. Eine größere Zahl Objektträger wird mit Alkohol und Äther sorgfältig gereinigt und getrocknet. Dann macht man den Stich in das Ohrläppchen des zu Untersuchenden. Der erste Tropfen wird fortgewischt. Er bildet sich nämlich relativ langsam und ist aus diesem Grunde (Beimischung von Gewebssaft) nicht verwertbar. Erst die folgenden sind brauchbar. Die Gerinnungszeit wird von dem Augenblicke der Tropfenbildung in der Wunde ab gerechnet, nicht von dem Augenblicke des Auffangens mittels Objektträger.

Die Aufnahme des Tropfens durch den Objektträger gestaltet sich etwas anders als bei *Milian*. Der Tropfen fällt nicht auf die Glasplatte, sondern wird bei horizontaler Haltung des Ohrläppchens durch leichte Berührung mit dem Objektträger auf diesen übertragen. Der Objektträger wird dann schnell umgedreht und auf eine Skala gelegt. Alle Tropfen, die mehr als 6 und weniger als 4 *mm* im Durchmesser haben, wischt man fort, der Rest dient zur Gerinnungsbestimmung nach *Milian* (s. oben).

Fig. 84.

A B

Methode von *Milian* bei durchfallendem Lichte. *A* vor, *B* nach der Gerinnung. (Aus *Hinman* und *Sladen*.)

Recht gut läßt sich der Gerinnungsablauf bei senkrecht gestelltem Objektträger auch im durchfallenden Lichte verfolgen. Solange noch (Fig. 84) keine Gerinnung erfolgt ist, sammelt sich das Blut vornehmlich in den abhängigen Partien des Tropfens. Diese sind dann weniger lichtdurchlässig. Nach Gerinnung des Tropfens erscheint das Zentrum dunkler.

Hinman und *Sladen* finden zwischen ihrer und der *Brodie-Russel*schen Methode gute Übereinstimmung, vorausgesetzt, daß die Größe der Tropfen sich zwischen 4 und 6 *mm* bewegt. Bei Zimmertemperatur beträgt die Gerinnungszeit 7—8'. Bei kleineren Tropfen ist sie kürzer. Die Methode ist sehr einfach und bequem. Der Haupteinwand liegt darin, daß die Ver-

dunstung zuweilen eine erhebliche Rolle spielen kann, besonders bei stark verlangsamter Gerinnung. *Hinman* und *Sladen* konnten in der Tat bei Kontrollversuchen in der feuchten Kammer eine Verzögerung gegenüber der gewöhnlichen Objektträgermethode feststellen. Indessen glauben sie, daß dieser Fehler praktisch nur von geringer Bedeutung ist.

Über Herstellung konstanter Temperaturbedingungen finden sich in den bisherigen Mitteilungen keine Angaben. Falls man keine Möglichkeit hat, bei konstanter Temperatur zu arbeiten, wird man auf absolute Werte verzichten und immer Kontrollversuche an normalen Personen unter gleichen Bedingungen ausführen.

5. Methode von *Bürker.*[1]) Ein Tropfen Blut wird in den Hohlschliff eines Objektträgers gebracht. Dessen obere Seite ist matt, der ganze Objektträger quadratisch zugeschnitten. Er kommt auf einen Konus von Kupferblech zu liegen, der in einem Hartgummiring steckt. Der Hartgummiring ist soweit viereckig ausgesägt, daß das quadratische Glasstück auf den Kupferkonus gelegt werden kann. Ein viereckiges Hartgummistück kann weiterhin so auf den Objektträger aufgelegt werden, daß es ihn mit Ausnahme des Hohlschliffes selber zudeckt. Dort ist die kleine Hartgummischeibe rund durchlocht. Über das ganze System kommt dann noch ein Hartgummideckel mit Handgriff.

Auf diese Weise ist das Glasstück oben und seitlich von einem schlechten Wärmeleiter umgeben, sitzt aber mit der Unterfläche dem guten Wärmeleiter Kupfer auf.

Der Kupferkonus taucht in Wasser ein, was dadurch erreicht wird, daß die Hartgummischeibe auf den oberen Rand eines mit Wasser gefüllten, zylindrischen Gefäßes aus Messing aufgesetzt ist. Der obere Rand des Gefäßes paßt in eine Rinne auf der Unterfläche der Hartgummischeibe. Letztere kann mit Hilfe des Griffes um eine vertikale Achse gedreht werden. Bei der Drehung rühren einige unten an der Gummischeibe befestigte Schaufeln das Wasser um.

Das auf drei Füßen ruhende, mit einem Hahn und einer Steigröhre versehene Messinggefäß ist also nach oben durch die Hartgummischeibe und seitlich durch eine ringsum befestigte Filzplatte vor nicht gewünschter Wärmeab- und -Zufuhr geschützt. Das Gefäß kann von unten her mit Hilfe einer kleinen Gasflamme erwärmt und dadurch das Wasser samt Kupferkonus und Glasstück genau auf derselben Temperatur erhalten werden. Ein Thermometer, durch eine Bohrung der Hartgummischeibe durchgesteckt, mißt die Temperatur des Wassers.

So ist dafür Sorge getragen, daß das im Hohlschliff des Glasstückes befindliche Blut möglichst genau die Temperatur des Wassers annimmt.

Ausführung eines Versuches: Wasser wird zunächst im zylindrischen Gefäß auf 25° gebracht und mit Hilfe eines kleinen regulierbaren

[1]) *Bürker,* Ein Apparat zur Ermittlung der Gerinnungszeit. *Pflügers* Arch. Bd. 118, S. 452 (1907).

Gasbrenners auf dieser Temperatur erhalten. Die Wassermenge beträgt zirka 1 Liter. Dann wird das Glasstück, besonders der Hohlschliff, mit Wasser ausgespült und mit einem feinen leinenen Tuche, das schon öfter gewaschen wurde, mit Äther-Alkohol abgerieben und getrocknet. Etwaige Stäubchen und Fäserchen, die noch zurückgeblieben sind, beseitigt man mit einem feinsten Haarpinsel.

Darauf kommt in die Mitte des Hohlschliffes ein Tropfen ausgekochten, destillierten Wassers. Dieses befindet sich in einer Bürette, die mit der *Mariotte*schen Anordnung für konstanten Ausfluß versehen ist. Der Druck, unter dem das Wasser austritt, beträgt 10 *cm* Wassersäule. Zur Fernhaltung von CO_2 ist ein Natronkalkröhrchen vorgelegt.

Glasstück + Wassertropfen wird dann auf den erwärmten Kupferkonus gelegt und einige Zeit gewartet, bis es die gewünschte Temperatur angenommen hat.

Dann wird mit Hilfe der *Francke*schen Nadel ein Blutstropfen aus der Fingerbeere entnommen und in den vorgewärmten Wassertropfen fallen gelassen. Sofort setzt man den Deckel wieder auf und bringt ein zeitmessendes Instrument in Gang.

Nunmehr reinigt man die Spitze eines fein ausgezogenen Glasstabes. Der zirka 0·5 *cm* dicke Stab ist 18 *cm* lang und von 13—18 *cm* zu einem feinen Glasfaden ausgezogen, der an der Spitze zirka 0·2—0·3 *mm* dick ist. Um ihn an der Spitze abzurunden, wird er einen Augenblick in eine leuchtende Gasflamme gehalten. Man muß stets eine Reihe solcher Glasstäbe vorrätig halten. Die Reinigung geschieht durch Eintauchen in Äther-Alkohol, dann wird der Glasstab vorsichtig mit dem Leinentuch getrocknet.

Nach der ersten $^1/_2$ Minute des Versuches dreht man die Hartgummischeibe mit Hilfe des Handgriffes um 90°, hebt den Deckel ab, geht mit dem Glasstab in die Mitte des Blutwassertropfens und beschreibt bis zur Peripherie des Tropfens fünf Spiraltouren, um Blut und Wasser zu mischen, ohne aber die Basis des Blutwassertropfens zu vergrößern. Darauf wird der Deckel wieder aufgesetzt, der Glasfaden von anhaftenden Spuren Blut und Wasser gereinigt.

Nach der zweiten $^1/_2$ Minute wird wieder gedreht (um 90°) und mit der Spitze des Glasfadens in einem Durchmesser durchgefahren oder entlang eines Halbkreises und so fort, alle $^1/_2$ Minute, bis man den ersten Fibrinfaden ziehen kann. Die Bestimmungen sind bis auf $^1/_2$ Minute genau.

Auf thermoelektrischem Wege bestimmte *Bürker* die Differenz zwischen Temperatur des Wassers und des Tropfens als sehr gering, zirka 0·5°.

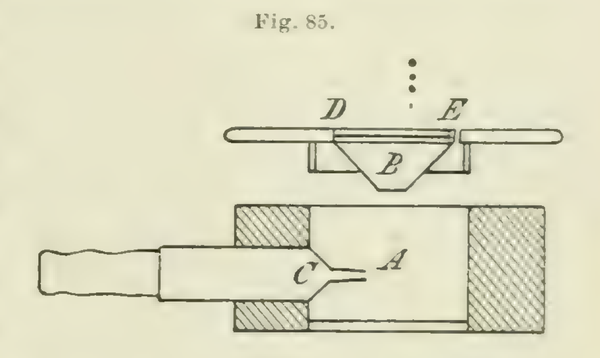
Die *Bürker*sche Methode ist in den letzten Jahren am Krankenbette viel verwendet worden. Die Resultate sollen bei größerer Übung zuverlässig sein.

(Der Apparat ist bei Universitäts-Mechaniker *Albrecht*-Tübingen zu haben.)

6. Methode von *Brodie* und *Russel.*[1]) Diese Methode enthält ein neues, originelles Prinzip: Ein Blutstropfen wird in einer feuchten Kammer durch einen tangential gerichteten Luftstrom in Bewegung gesetzt und diese Bewegung durch das Mikroskop bei schwacher Vergrößerung beobachtet. Ist das Blut geronnen, so hört die Bewegung auf.

Im einzelnen sieht man dabei Folgendes: Im Beginn des Versuches genügen sehr schwache Luftstöße schon, den Tropfen in rotierende Bewegung zu setzen. Die Blutkörperchen bewegen sich einzeln, ohne Häufchen zu bilden. Allmählich fangen sie an zu verklumpen, wobei hellere Zwischenräume auftreten. Sehr bald hört dann jede stärkere Beweglichkeit auf. Die Blutzellen geben zwar einem Luftstrom noch ein wenig nach, federn aber sofort in ihre alte Lage zurück. Dieser Zeitpunkt, in dem also der Blutstropfen zwar noch durch den Luftstrom ein wenig von der Peripherie nach dem Zentrum hin zusammengedrückt werden kann, seine Form aber sofort wieder annimmt und alle sonstigen Bewegungen zirkulärer Art im Tropfen aufgehört haben, ist der Augenblick der Gerinnung. Der Zeitpunkt ist nach einiger Übung ziemlich leicht zu bestimmen.

Fig. 85.



Schema des *Brodie-Russel*schen Koagulometers im Querschnitt. Modifikation von *Boggs*. (Nach *Boggs*.)

Das zur Ausführung der Methode von *Brodie* und *Russel* angegebene Instrument besteht aus einer runden, zirka 1 *cm* hohen und 3 *cm* breiten Luftkammer *A*, die nach unten durch eine Glasplatte, nach oben durch einen leicht abnehmbaren, ebenfalls mit Glaseinlage versehenen Metalldeckel *D-E* abgeschlossen wird (Fig. 85).

Die seitlichen Wände bestehen bei dem ursprünglichen Apparat aus einem Metallhohlring, in dem beliebig temperiertes Wasser zirkulieren kann. Ein Ein- und ein Ausflußrohr dienen der Wasserzirkulation. Außerdem ist in den durchbrochenen Deckel *D-E* ein Glaskonus *B* eingelassen, dessen abgestumpftes unteres Ende zur Aufnahme des Blutstropfens dient. Die seitliche Wand der Kammer ist nun weiterhin noch von dem Rohre *C* durchsetzt. Dieses steht nach außen mit einem kleinen Gebläse in Verbindung und ist an seiner Einmündung in die Kammer zu einer feinen Spitze ausgezogen, die so angeordnet ist, daß bei geschlossener Kammer der durch *C* eintretende Luftstrom gerade die Oberfläche des Konus *B* tangential berührt. Die eingeblasene Luft entweicht durch eine oder zwei kleine Öffnungen, die man beliebig anbringen kann.

Boggs[2]) hat den *Brodie-Russel*schen Apparat durch Fortlassen des Wassermantels vereinfacht. (Zu beziehen durch Univ.-Mechaniker *Albrecht* Tübingen.)

[1]) *Brodie* und *Russel*, The determination of the coagulation of blood. Journ. of Physiol. XXI. p. 403 (1897).

[2]) *Boggs*, Some clinical aspects of blood coagulation. Internat. Clinics. Vol. I 18th Series (1907), S. A.

Ausführung eines Versuches: Der unter den gewöhnlichen Vorsichtsmaßregeln aus Ohr oder Fingerbeere gewonnene Blutstropfen (er soll nicht zu groß sein) wird mit der glattgeschliffenen Oberfläche des Glaskonus *B* berührt. Es ist leicht, auf diese Weise einen Tropfen genau von der Größe der geschliffenen Glasfläche zu bekommen. Dann wird die Kammer schnell geschlossen und umgekehrt (*D-E* nach unten) unter das Mikroskop gelegt. Nun beobachtet man, indem man von Zeit zu Zeit durch Druck auf das Gebläse einen leichten Luftstrom gegen den Tropfen richtet, die Bewegungen der Erythrozyten. Diese zeigen sukzessive die oben (S. 245) beschriebenen Veränderungen. Der zeitliche Ausgangspunkt für die Gerinnungsbestimmung ist nicht der Augenblick der Kammerfüllung, sondern das Erscheinen des Blutstropfens in der Wunde. Ein für allemal muß man sich daran gewöhnen, das Ende der Gerinnung erst dann anzunehmen, wenn die oben näher beschriebene „elastische radiale" Bewegung des Tropfens eingetreten ist. Die Zusammenballung der Blutkörperchen oder eine mehr oder minder ausgesprochene Zunahme der Viskosität des Tropfens darf nicht als Endpunkt angesehen werden. Allerdings ist auch die elastisch-radiale Bewegung nach *Hinman* und *Sladen* (l. c.) nur eines der vielen Momente im Gerinnungsprozeß, aber doch jenes, dessen Eintritt am schärfsten bestimmt werden kann. *Pratt* [1]), *Murphy* und *Gould* [2]) haben frühere Stadien als Endpunkte angesehen. Daher stammen wohl auch die einander widersprechenden Angaben über die normale Gerinnungszeit, soweit sie mit diesem Instrument gewonnen wurden. *Pratt* gibt 4—5' an, *Murphy* und *Gould* 3' 12", *Brodie-Russel* bei einer Temperatur von 20° 7—8'. *Hinman* und *Sladen* finden als Durchschnitt von 214 Beobachtungen 6' 40". Auch bei ihnen sind die Schwankungen, selbst bei ein- und derselben Versuchsperson, recht bedeutend. Auch finden sie starke Tagesschwankungen. Das widerspricht den Erfahrungen von *Addis* [3]) und *Hartmann*. [4])

Die Differenzen erklären sich zum Teile wohl auch durch die verschiedene Größe der glatt geschliffenen Glasfläche des Konus *B*. Je größer diese ist, um so größer fällt auch der Tropfen aus. Hierdurch verändert sich natürlich die Gerinnungszeit. Man wird also stets die Fläche des Konus messen und nur solche Befunde miteinander vergleichen dürfen, die mit ganz gleichen Instrumenten gewonnen wurden.

Auch die Art des Anblasens ist von Belang. Je häufiger man den Tropfen durch den Luftstrom in Bewegung setzt, um so schneller gerinnt er. Auch sieht man dann nicht selten am Rande des Tropfens Eintrocknungserscheinungen, die natürlich ebenfalls die Gerinnung beeinflussen

[1]) *Pratt*, Observations upon the coagulation time of blood, and blood plates. Journ. Med. Research. V. p. 120 (1903).

[2]) *Murphy* and *Gould*, Coagulation time of the blood, a comparison between the Wright and the *Brodie-Russel* instruments etc. Boston. Med. and Surg. Journ. p. 45 (1904).

[3]) *Addis* l. c.

[4]) *Hartmann* l. c.

(S. 243). Man soll also nicht zu häufig und nicht zu stark blasen. Vollständige Konstanz läßt sich wohl schwer erreichen, ein Faktor, der entschieden am allermeisten der Zuverlässigkeit dieser Methode Abbruch tut.

Natürlich ist der Glaskonus nach jedem Versuche sorgfältig zu reinigen und abzutrocknen. Am besten arbeitet man in einem konstant temperierten Raume. Den Wassermantel von *Brodie-Russel* halte auch ich mit *Boggs* für unnötig. Mit dem Gebläse bringt man ja doch von Zeit zu Zeit andere temperierte Luft in die Kammer.

Nach eigenen Erfahrungen scheint es mir, daß die so geistreich ersonnene Methode im ganzen mehr Fehlerquellen bietet als die meisten anderen. Jedenfalls erhält man nur bei sehr großer Übung einigermaßen zuverlässige Resultate.

7. Methode von *Morawitz* und *Bierich*.[1]) Das Blut wird nicht durch Hautschnitt, sondern beim Menschen durch Venenpunktion, bei Tieren aus einer Arterie entnommen. Dadurch vermeidet man Beimischung gerinnungsbefördernder Substanzen aus Haut und Geweben. Die zweite Abweichung den vorher erwähnten Methoden gegenüber besteht darin, daß nicht mit einem einzigen Blutstropfen, sondern mit größeren Blutmengen gearbeitet wird. Die Gerinnungszeit ist natürlich viel länger als bei anderen Methoden. Das erscheint vorteilhaft, insofern als Unterschiede der Gerinnungszeit sich dann deutlicher und schärfer markieren.

Ausführung eines Versuches: Die leicht gestaute Armvene wird mit einer sauberen, trockenen oder auch mit Kochsalzlösung ausgespritzten, 10 cm^3 fassenden Spritze punktiert. Alkali (etwa von der zum Auskochen verwandten Sodalösung) darf der Spritze nicht anhaften. Je 5 cm^3 Blut kommen in sorgfältig gereinigte (Wasser, Alkohol, Äther) Wiegegläschen, die von gleicher Größe und Gestalt sind. Sie werden in eine mit Thermometer versehene feuchte Kammer gestellt. Annähernde Temperaturkonstanz läßt sich durch Füllen eines Teiles der Kammer mit Wasser von wechselnder Temperatur herstellen. Gewöhnlich habe ich bei 20° gearbeitet. Die Wiegegläschen sollen schon einige Zeit vor Beginn des Versuches verschlossen in die temperierte Kammer gestellt werden, damit sie die gewünschte Temperatur annehmen.

Ist der Versuch im Gange, so lüftet man von Zeit zu Zeit den Deckel der Kammer und überzeugt sich durch leichtes Neigen der Gläschen von dem Zustande des Blutes. Den Gerinnungsbeginn erkennt man an einem leichten rötlichen Belag an den Glaswänden. Vollendet ist die Gerinnung, wenn die Oberfläche des Blutes erstarrt ist und der Neigung des Gläschens nicht mehr folgt. Der Deckel soll nicht häufiger als alle 2′ gelüftet werden. Möglichst gleichmäßiges Vorgehen beim Herausnehmen und Neigen der Gläschen ist anzustreben. Die Gerinnung erfordert unter

[1]) *Morawitz* und *Bierich*, Über die Pathogenese der cholämischen Blutungen Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. Bd. 56. S. 115 (1906).

diesen Bedingungen 15—20'. Eine Differenz von 20% kann noch in den Bereich der Fehler fallen. Nur größere Differenzen dürfen berücksichtigt werden.

Fehlerquellen sind: 1. Der wechselnde Gasgehalt des Blutes. Es muß sich das bei starker Stauung besonders bemerkbar machen. Blut, das viel CO_2 enthält, gerinnt langsamer. 2. Ungenügende Übereinstimmung beim Verfahren zur Kontrolle der Gerinnung. In dem einen Falle wird das Wiegegläschen samt Inhalt stärker bewegt als in dem anderen. 3. Ungleichmäßige Bestimmung des Endpunktes der Gerinnung. Diese zieht sich über eine Zeit von mehreren Minuten hin. Man muß also daher durchaus einen bestimmten Punkt als Endpunkt fixieren. Am meisten schien mir hierfür das Erstarren der Oberfläche des Blutes geeignet zu sein.

Die Methode soll möglichst in Kombination mit einer der anderen angewendet werden, die nur kleine Blutmengen erfordert. Findet man mit beiden Verfahren Gerinnungsänderungen im gleichen Sinne, so ist damit Gewähr für die Richtigkeit der Beobachtung gegeben.

8. Methode von *Buckmaster.*[1]) Ein Blutstropfen wird in einer Drahtschlinge aufgefangen und in einer feuchten Kammer bei beliebiger Temperatur beobachtet. Von Zeit zu Zeit wird die Drahtschlinge um ihre Achse gedreht. Man kann dann leicht mit einer Linse das Hinabsinken der roten Blutkörperchen im Tropfen beobachten. Es geschieht ziemlich schnell. Gerinnung ist dann eingetreten, wenn sich so viel Fibrin gebildet hat, daß die Blutkörperchen bei Drehung der Schlinge nicht mehr schnell nach unten sinken.

Die Vorteile dieser Versuchsanordnung sind nach *Buckmaster* folgende: 1. Die Einfachheit der Methode; 2. die geringen Blutmengen, die man braucht; 3. der Kontakt mit Fremdkörpern ist auf das geringste Maß beschränkt; 4. das Blut wird nicht geschüttelt oder umgerührt; 5. die Bestimmung des Endpunktes ist scharf und bis auf zirka ½ Minute genau. Als Durchschnittszeiten für menschliches Blut gibt *Buckmaster* folgende Werte an:

20° C.	8' 45''.
31° C.	5' 45''.
38° C.	3' 56''.
39° C.	2' 56''.

Wichtig für die Ausführung des Versuches ist vor allem gleichmäßige Gestalt und Größe der Platinöse, respektive Drahtschlinge. Natürlich muß sie vor Beginn des Versuches sorgfältig gereinigt und getrocknet werden. Für die Blutentnahme selbst kommen die auch sonst üblichen Kautelen in Betracht. Der Apparat läßt sich leicht improvisieren: Man nimmt einen schmalen, rechteckigen Holzkasten, der an seinen beiden Längswänden Fenster hat. Die Platinöse wird mittelst ihres Stieles so durch eine Öffnung

[1]) *Buckmaster*, Model of a new form of coagulometer. 7. internationaler Physiologenkongreß. Heidelberg 1907.

in einer der Schmalseiten des Kastens durchgesteckt, daß die Blutstropfen gerade zwischen den beiden Glasscheiben erscheint. Die Distanz zwischen Glasscheibe und Drahtschlinge muß so gewählt sein, daß man den Tropfen von außen mit einer guten Stativlupe genau einstellen kann. Auch die Umdrehung der Drahtschlinge kann von außen mit Hilfe des Stieles besorgt werden. Zur Herstellung konstanter Temperatur und einer feuchten Atmosphäre dient eine kleine Wasserwanne am Boden des Apparates. Der Deckel wird von einem Thermometer durchsetzt.

Eigene Erfahrungen mit dieser Methode besitze ich nicht.

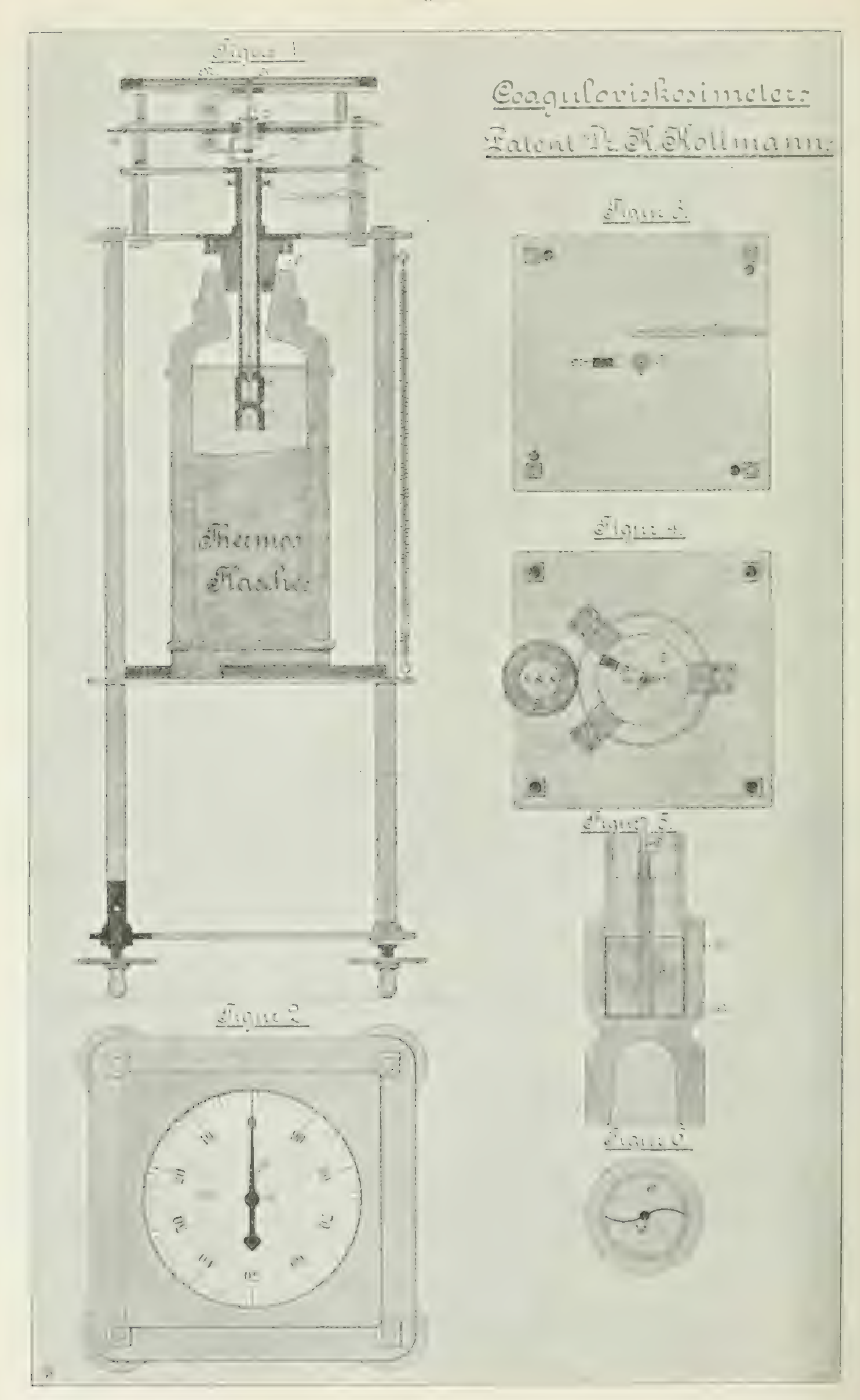
9. Der Koaguloviskosimeter von *Kottmann*.[1]) Neu und originell ist der Weg, den *Kottmann* kürzlich mit der Konstruktion des Koaguloviskosimeters beschrieben hat. Sein Prinzip ist folgendes: Läßt man ein mit Flüssigkeit gefülltes Gefäß um eine senkrechte Achse rotieren, so werden die der Gefäßwand benachbarten, periphersten Flüssigkeitsschichten in dieselbe Rotation geraten. In Abhängigkeit von dem Viskositätsgrade der Flüssigkeit überträgt sich die Rotation in nach dem Zentrum abnehmender Weise auch auf die anderen Schichten. Ein genau in die Mitte der Flüssigkeit eintauchendes Schäufelchen, das nicht direkt mit in Rotation versetzt wird, muß also, falls es beweglich angebracht ist, eine Ablenkung erfahren. Diese ist um so stärker, je schneller das mit Flüssigkeit gefüllte Gefäß rotiert und je visköser die Flüssigkeit ist. Da nun Blut während der Gerinnung durch Ausscheidung des Fibrins seine Viskosität ändert, scil. visköser wird, muß sich der Gerinnungseintritt durch eine stärkere Ablenkung des Schäufelchens dokumentieren. Durch eine geeignete Vorrichtung wird verhindert, daß die Schaufel selbst in rotierende Bewegungen gerät.

Die genauere Beschreibung des Apparates ist an der Hand der nebenstehenden Zeichnungen (Fig. 86, 1—6) verständlich. „Das Nickelgefäß *A* mit dem inneren Durchmesser von 1 *cm* wird, nachdem es mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllt ist, mit einer vertikalen Metallhülse *B* wasserdicht verbunden, damit es während der Untersuchung in ein Wasserbad mit konstanter Temperatur getaucht werden kann. Die vertikale Hülse *B* wird, wie in Fig. 1 und 5 ersichtlich, auf ein inneres Metallrohr geschoben, das durch einen uhrwerkartigen Motor in rotierende Bewegung versetzt wird. Dadurch überträgt sich die gleiche Rotation auch auf die Metallhülse *B* und durch diese auf das Gefäß mit der Untersuchungsflüssigkeit (Blut, Milch, Fibrinogenlösung). Das Gefäß mit Flüssigkeit macht also eine konstante Tourenzahl pro Minute.

Für Bestimmungen des Koagulationsverlaufes von Blut erwies sich eine Tourenzahl von 12—15 pro Minute am günstigsten. Hält man in allen Versuchen die gleiche Tourenzahl ein, so erhält man gut vergleichbare Resultate.

[1]) *Kottmann*, Der Koaguloviskosimeter mit spezieller Berücksichtigung seiner klinischen Verwendbarkeit etc. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 69. S. 415 (1910).

Fig. 86.


Coaguloviskosimeter.
Patent Dr. R. Kollmann.
Thermos Flasche

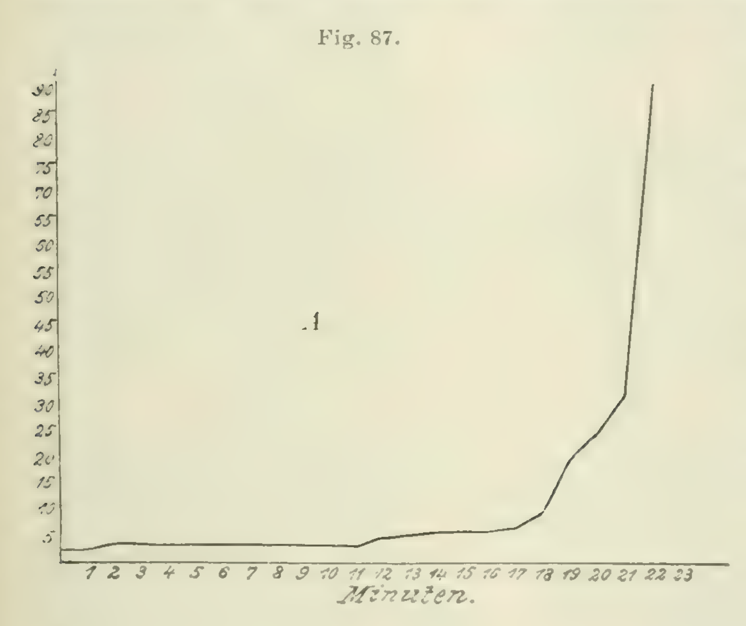
Erläuterung der Fig. 86, 1—6.

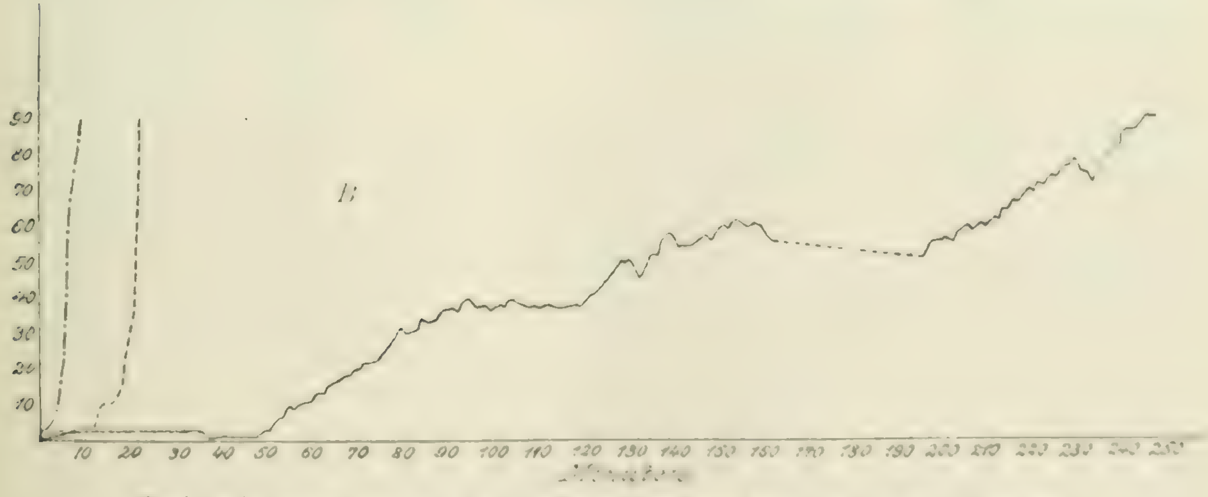
Figur 1. Längsschnitt.
Figur 2. Ansicht von oben.
Figur 3. Ansicht von oben eines Querschnittes oberhalb der Spiralfeder *J*.
Figur 4. Ansicht von oben eines Querschnittes oberhalb der Drehscheibe *G*.
Figur 5. Gefäß, Metallhülse, Metallrohr, Schäufelchen und Achse. Vergrößerung der entsprechenden Partie der Figur 1.
Figur 6. Querschnitt von 5 durch das Schäufelchen.

A = Gefäß. *B* = rotierende Metallhülse. *C* = Schäufelchen. *D* = Achse. *E* = Bügel. *F* = Tragarm mit Lagerung. *G* — Drehscheibe, an der Peripherie gezahnt. *H* = gezahntes Handrad für Drehscheibe. *J* = Spiralfeder. *K* = Zeiger. *L* = Korkzapfen zum Verschluß der Thermoflasche. *M* = Zifferblatt. *N* = Achsenführung. *O* = Zapfensteinlager.

In das Gefäß *A* taucht nun senkrecht und genauestens zentriert die feststehende, aber äußerst leicht in Rotation versetzbare stählerne Achse *D* ein, die durch das Zapfenlager *O* mit dem Bügel *E* verbunden ist. Sie trägt an ihrem unteren Ende das Schäufelchen *C*, an ihrem oberen einen Zeiger und ist außerdem mit einer feinen Spiralfeder *J* verbunden. Die Spiralfeder, die außerdem noch (s. Fig. 80) an einem festen Punkt befestigt ist, verhindert eine freie Mitrotation des Schäufelchens mit der Flüssigkeit und gestattet diesem nur einen gewissen Ausschlag. Dieser Ausschlag, der dem Gerinnungsgrade respektive der Viskosität der untersuchten Flüssigkeit proportional ist, wird durch den Zeiger *K* in vergrößertem Maßstabe auf dem Zifferblatte *M* zum Ausdruck gebracht."

Fig. 87.





Zwei Gerinnungskurven mit dem Koaguloviskosimeter gewonnen. Nach *Kottmann*.
——— = Kurve I. *A* normales Blut, *B* Blut eines Haemophilen.
.... = Kurve II. Blut des Haemophilen bei Zusatz von Blutserum.
—·—·— = Kurve III. Desgl. + Thrombokinase.

Für die Gerinnungsbestimmung des Blutes genügt ein Zeigerausschlag bis 90°, also eine nur einmalige Umdrehung der Schaufel vollständig. Bei Viskositätsbestimmungen anderer Flüssigkeiten läßt sich durch eine in der Originalarbeit näher beschriebene Vorrichtung durch Verschieben des Flügels *F* auch eine mehrfache Umdrehung des Zeigers möglich machen. An Stelle des Schäufelchens kann man auch einen Zylinderansatz an die Achse *D* anbringen. Dadurch gestalten sich die Ausschläge größer, die Gerinnungszeit wird abgekürzt und die Methode noch weiter verfeinert.

Das Blut wird durch Venaepunctio entnommen. Es soll nicht erst mit einer Spritze aspiriert werden, sondern direkt aus der Vene durch einen kleinen Metallansatz in das Nickelgefäß *A* eintreten. Für Temperaturkonstanz ist durch Versenkung des Nickelgefäßes in ein Wasserbad gesorgt, das sich in einer Thermosflasche befindet. Fig. 1 gibt diese Verhältnisse klar wieder.

Die beiden nebenstehenden Kurven (Fig. 87) erläutern die mit dieser Methode gewonnenen Resultate. Bei 20° ist die Gerinnung in etwa 20′ vollendet, der Beginn scheint etwas weniger konstant zu sein. Bei 40° gerinnt das Blut schon in 6′. Für das Studium der Gerinnungsverhältnisse Haemophiler und Kropfkranker hat sich der Apparat in den Händen *Kottmanns* bewährt.

Von allen hier aufgeführten Methoden scheint die zuletzt erwähnte den Vorzug zu verdienen. Eigene Erfahrungen stehen mir leider nicht zu Gebote. Überlegt man aber die mannigfaltigen Fehlerquellen, denen die meisten übrigen Verfahren unterworfen sind, so wird man die Vorteile des *Kottmann*schen Apparates anerkennen. Einer ausgedehnteren Verwendung steht leider der hohe Preis (475 Frcs.) im Wege. (Der Apparat wird in dem Sanitätsgeschäft *M. Schaerer*, A.-G. Bern, Bubenbergplatz, hergestellt.)

Viel gerühmt, besonders von klinischer Seite, wird auch die *Bürker*sche Methode. Immerhin scheint sie mir viel mehr Fehlermöglichkeiten zu bieten als der Koaguloviskosimeter. Für letzteren fällt ganz besonders die Tatsache ins Gewicht, daß keine größere Übung erforderlich ist, da alle Bewegungen durch maschinelle Kräfte besorgt werden.

Endlich mag noch darauf hingewiesen werden, daß quantitative Thrombinbestimmungen im Blutserum, wie sie z. B. von *Birnbaum* und *Osten*[1]) versucht worden sind, selbstverständlich nicht dasselbe bedeuten, wie die direkte Bestimmung der Gerinnungszeit. Ich möchte diesen Punkt nachdrücklich hervorheben, da immer wieder Bestrebungen sich geltend machen, beide Begriffe zu konfundieren und eine Methode der Gerinnungsbestimmung auf die Untersuchung des Fermentgehaltes im Blutserum zu gründen. Das ist nicht zulässig; denn ein großer Teil des bei der Gerinnung gebildeten Thrombins wird mit den Fibringerinnseln entfernt, eine weitere, sehr

[1]) *Birnbaum* und *Osten*, Untersuchungen über die Gerinnung des Blutes während der Menstruation. Arch. f. Gynäkol. Bd. **80**. H. 2. S. 373 (1905).

große Menge geht bald nach vollendeter Gerinnung in die unwirksame Modifikation des Metathrombins über (S. 274). Außerdem ist die Gerinnungszeit ja nicht allein von der Menge des Thrombins, sondern auch sehr wesentlich von der Schnelligkeit der Fermententwicklung abhängig.

III. Methoden zur Gewinnung fibrinogenhaltiger Flüssigkeiten.

Die hier erwähnten Methoden dienen zur Gewinnung von Lösungen, die das Reagenz auf Fibrinferment und seine Vorstufen darstellen. Diese Lösungen sollen daher 1. nicht von selbst gerinnen und 2. trotzdem Fibrinogen in gerinnungsfähigem Zustande enthalten. Es gibt viele Möglichkeiten zur Herstellung solcher Lösungen. Am idealsten entspricht eine reine Fibrinogenlösung dieser Aufgabe. Sie soll nur Fibrinogen enthalten, dagegen keine anderen Eiweißkörper und vor allem keine Vorstufen des Thrombins. Für gewisse Zwecke kommen auch noch andere Plasmaarten in Betracht. Allerdings sind sie als Indikatoren für Thrombin nicht gleichwertig. Die Ursachen für die Stabilität, also die mangelhafte Gerinnbarkeit dieser Plasmaarten, können eben sehr verschiedenartig sein. Manche werden nicht allein durch Thromben, sondern auch schon durch eine der Thrombinvorstufen zur Gerinnung gebracht, ein Zeichen dafür, daß alles, was sonst zur Thrombinbildung nötig ist, bereits in diesen Lösungen präexistiert. So gerinnt z. B. das an sich stabile Gansplasma sehr schnell auf Zusatz von Muskelextrakt. Man darf nun aber keineswegs daraus schließen: der Muskelextrakt enthält Thrombin. De facto enthält er auch nur eine Vorstufe des Thrombins. Alles, was sonst zur Gerinnung erforderlich ist, findet er im Plasma. Auf diesen Punkt ist längere Zeit nicht ausreichend geachtet worden. Gerade der Umstand, daß der eine Untersucher dieses, der andere jenes stabile Plasma als Reagenz für Thrombin wählte, hat zu manchen Unklarheiten geführt.

Manche stabile Plasmaarten verdanken ihre Beständigkeit ausschließlich dem Mangel löslicher Kalksalze. Hier wird natürlich schon Zusatz von Kalksalzen allein Gerinnung hervorrufen können. Stets muß man sich also überlegen, ob das Reagenz auf Thrombin, das man anwendet, außer dem Fibrinogen auch noch andere Substanzen enthält, die den Gerinnungsvorgang zu beeinflussen, respektive auszulösen vermögen.

A. Fibrinogenlösungen.

1. Fibrinogenlösung nach *Hammarsten.*[1])

Prinzip der Methode: Das Fibrinogen wird aus Blutplasma schon bei halber Sättigung mit Kochsalz ausgefällt, die anderen Eiweißkörper erst bei höheren Konzentrationen. Das durch Kochsalz niedergeschlagene Fibrinogen wird durch mehrfache Wiederholung von Fällung und Lösung gereinigt.

[1]) *Hammarsten*, Über die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 22. S. 333 (1896).

Man geht am besten vom Pferdeblut aus. Dieses wird im Schlachthause in einem großen Gefäße aufgefangen, das etwas Kalium- oder Natriumoxalat in Lösung enthält. Die Menge der Natriumoxalatlösung ist so zu bemessen, daß die Konzentration des Salzes nach Auffangen des aus der Wunde strömenden Blutes etwa 0·2—0·5% beträgt. Will man ungefähr 5 Liter Pferdeblut auffangen, so kann man in das zum Auffangen bestimmte Gefäß zuvor 500 *cm*³ 2—3%iger Natriumoxalatlösung bringen. Das so gewonnene „Oxalatblut" gerinnt nicht, da es keine ionisierten Kalksalze enthält.

Ich folge nun der von *Nolf*[1]) angegebenen Methodik, die einige Verbesserungen des ursprünglichen *Hammarsten*schen Verfahrens enthält: Das Oxalatblut wird gleich nach seiner Ankunft aus dem Schlachthause scharf abzentrifugiert, das abgehobene, vollständig zellfreie Plasma (800 bis 900 *cm*³) auf 0° abgekühlt und bei niedriger Temperatur filtriert. Schon *Hammarsten* hat empfohlen, das Plasma längere Zeit, etwa eine Nacht, bei niederer Temperatur stehen zu lassen. Es fällt dabei ein nukleoproteidhaltiger Niederschlag aus, der Proferment enthält, also wohl Thrombogen und Thrombokinase. Erst nach Entfernung dieses Niederschlages kann man mit einiger Sicherheit darauf rechnen, wirklich brauchbare Fibrinogenlösungen zu erhalten, d. h. also Lösungen, die nur auf Zusatz von Thrombin gerinnen.

Das eiskalte, filtrierte Plasma wird mit wenig verdünnter Essigsäure gegen Lackmuspapier neutralisiert und reines, kalkfreies Kochsalz zugesetzt, bis die Flüssigkeit ein spezifisches Gewicht von 1·110 angenommen hat. Das Fibrinogen fällt nun in großen, sich zusammenballenden Flocken aus. Diese können leicht mit einem Hornlöffel oder einem siebartigen Instrument aus dem Plasma in 800—900 *cm*³ destillierten Wassers übertragen werden. Das destillierte Wasser soll eine Spur Natriumoxalat, etwas Kochsalz und 5 *cm*³ einer gesättigten Sodalösung enthalten. Man nimmt also die Fällung des Fibrinogens stets bei neutraler, die Lösung bei leicht alkalischer Reaktion vor (*Heubner*[2]). Arbeitet man mit Pferdeplasma, so ist allerdings dieser Kunstgriff nicht so wichtig. Auch ohne ihn gewinnt man brauchbare Fibrinogenlösungen. Anders bei Rinderplasma. Ohne Neutralisation gelingt es meist überhaupt nicht, durch Halbsättigung mit Kochsalz das Fibrinogen zur Ausflockung zu bringen. Ebenso löst sich das aus Rinderplasma niedergeschlagene Fibrinogen nur bei leicht alkalischer Reaktion.

Die erste Fällung des Pferdefibrinogens löst sich meist schnell und vollständig. Die Lösung kann durch Umrühren der Flüssigkeit befördert werden. Vom Ungelösten filtriert man ab. Nun wird die klare, leicht alkalische Flüssigkeit durch vorsichtigen Zusatz dünner Essigsäure wieder

[1]) *Nolf*, Contrib. à l'étude de la coagulation du sang. 3e mémoire. Arch. internat. de Physiol. VI. H. 1. SA. p. 3 (1908).

[2]) *Heubner*, Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. Arch. f. experimen. Pathol. und Pharm. Bd. **49**. S. 229 (1903).

gegen Lackmus neutralisiert. Bildet sich dabei ein leichter, grobflockiger Niederschlag, so ist er durch Gaze abzufiltrieren. Das Filtrat wird abgekühlt und in derselben Weise mit Kochsalz gefällt wie das Plasma. Der zweite Niederschlag kann, wenn er an Masse gegen den ersten zurücksteht, in etwas weniger Wasser (400—500 cm^3) übertragen werden. Man fährt nun in dieser Weise mit Fällen und Lösen des Fibrinogens fort. Doch soll das Wasser, in dem man den 3. Niederschlag auflöst, keinen Oxalatzusatz mehr erhalten. Der 4. Niederschlag wird in etwa 150—300 cm^3 Wasser übertragen. Dem Wasser hat man vorher ein wenig Soda (5—6 Tropfen auf 300 cm^3) zugesetzt. Man fügt nun noch so viel Kochsalz hinzu, daß die Salzkonzentration ungefähr 1%, beträgt. Die Fibrinogenlösung bleibt bis zum nächsten Tage bei 0° stehen und wird durch Leinen koliert.

1 Liter Plasma gibt ungefähr 150—500 cm^3 Fibrinogenlösung. Trotz großer Verluste bei der Reinigung ist diese Lösung zu konzentriert. Sie wird zum Versuch mit der 5- bis 10fachen Menge 1%iger Kochsalzlösung verdünnt.

Zuweilen erlebt man trotz aller Vorsicht Spontangerinnungen der Fibrinogenlösung. Es müssen also Vorstufen des Thrombins auch noch in die letzte Fibrinogenfällung übergegangen sein. In anderen Fällen gerinnt die Fibrinogenlösung zwar nicht von selbst, wohl aber auf Zusatz von Kalk oder Gewebsextrakt + Kalk. Auch solche Lösungen sind keine zuverlässigen Indikatoren für Thrombin.

Eine gute Fibrinogenlösung soll nur auf Zusatz von Thrombin gerinnen. Durch *Morawitz*[1]), *Nolf*[2]), *Schittenhelm* und *Bodong*[3]), *Rettger*[4]) ist jetzt oft genug festgestellt worden, daß man solche Lösungen gewinnen kann. Gegenteilige Angaben von *Pekelharing*[5]) und *Mellanby*[6]) kann ich nicht anerkennen. *Nolf* weist allerdings darauf hin, daß auch die sogenannten reinen Fibrinogenlösungen sicher nicht im strengen Sinne des Wortes „rein" sind, d. h. nur Fibrinogen enthalten. Häufig führen sie auch noch etwas Thrombogen. Durch stärkere Verdünnung läßt sich der störende Einfluß des Thrombogens beseitigen. *Nolf* arbeitet meist mit Fibrinogenlösungen, die so stark verdünnt sind, daß sich eben noch ein dünnes, gallertiges Fibrinogengerinnsel bilden kann.

Am leichtesten und sichersten gelingt die Darstellung von Fibrinogen aus Pferdeplasma. Rinderplasma ist weniger geeignet; denn erstens fällt

[1]) *Morawitz*, Zur Kenntnis der Vorstufen des Fibrinferments. *Hofmeisters* Beiträge. IV. S. 381 (1903).

[2]) *Nolf* l. c.

[3]) *Schittenhelm* und *Bodong*, Beitrag zur Frage der Blutgerinnung etc. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. Bd. 54. S. 217 (1905/06).

[4]) *Rettger*, The coagulation of blood. Amer. Journ. of Physiol. Vol. 24. 1. Juli p. 406 (1909).

[5]) *Pekelharing*, Ein paar Bemerkungen über Fibrinferment. Biochem. Zeitschr. Bd. 11. 1 (1908).

[6]) *Mellanby*, Coagulation of blood. Journ. of Physiol. Vol. 38. p. 28 (1908/09).

das Fibrinogen nur bei sehr sorgfältiger Neutralisation des Plasma (s. oben) aus und zweitens zeigt das Präzipitat oft eine feinflockige Konsistenz und wenig Neigung, sich zusammenzuballen. Es ist daher oft schwierig, den Niederschlag in destilliertes Wasser zu übertragen. Zuweilen läßt sich das Zusammenballen durch Zusatz von ein wenig Alkali, z. B. Soda, befördern. Die Flocken steigen dann nach oben, so daß man dekantieren kann. Auch die Lösung des Fibrinogens in destilliertem Wasser gelingt bei Rinderplasma schlecht. Man hat große Verluste. Die Gewinnung einwandfreier Fibrinogenlösungen aus Rinderblut erfordert Übung und Geduld. Immerhin ist es mir, als mir kein Pferdeplasma zu Gebote stand, gelungen, gute Fibrinogenlösungen aus Rinderblut herzustellen.

Rettger empfiehlt Katzenblut. Zur Entfernung jeder Spur von Oxalaten dialysiert er zum Schluß seine Fibrinogenlösung gegen 0·9%ige kalkfreie Kochsalzlösung.

2. Fibrinogenlösung nach *A. Schmidt* und *Mellanby* (l. c.).

Von verschiedenen Seiten ist der *Hammarsten*schen Methode (wohl mit Unrecht) der Vorwurf gemacht worden, sie sei zu eingreifend. Das Fibrinogen sollte bei mehrfacher Kochsalzfällung andere Eigenschaften annehmen, speziell an Gerinnungsfähigkeit einbüßen.

A. Schmidt hatte daher einen anderen Weg der Fibrinogendarstellung beschritten. Das Prinzip der Methode ist folgendes: Aus stark verdünntem Plasma (Oxalatplasma, Vogelplasma etc.) wird das Fibrinogen durch gelinden Essigsäurezusatz ausgefällt, abzentrifugiert und in Wasser gelöst.

Mellanby verfährt in folgender Weise: Vogelplasma (über dessen Gewinnung s. S. 264) wird mit 20 Volumina destillierten Wassers verdünnt. Es entsteht kein Niederschlag. Nun fügt man vorsichtig und tropfenweise 0·1% Essigsäure hinzu. Schnell bildet sich ein massiger Niederschlag. Er wird abzentrifugiert und in destilliertem Wasser gelöst. Die Menge des destillierten Wassers entspricht der ursprünglichen Plasmamenge.

Diese Fibrinogenlösungen gerinnen bereits langsam auf Zusatz von Kalksalzen, schnell mit verschiedenen Gewebssäften. Sie enthalten — bei der Art der Herstellung ist das ja auch nicht anders zu erwarten — neben Fibrinogen offenbar auch noch alle Thrombinvorstufen. Daher sind sie den *Hammarsten*schen Fibrinogenlösungen nicht gleichwertig. Als zuverlässige Indikatoren für Thrombin dürfen sie nicht gelten.

3. Seröse Körperflüssigkeiten. (Natürliche Fibrinogenlösungen.)

Seit *Buchanan* und *A. Schmidt* werden seröse Trans- und Exsudate häufig zu Gerinnungsversuchen verwandt. Sie sind nun keineswegs immer „reine" Fibrinogenlösungen, sondern enthalten häufig auch noch einen Teil oder gar die Gesamtheit der zur Gerinnung erforderlichen Substanzen. Die meisten entzündlichen Exsudate gerinnen entweder bereits in den serösen Höhlen des Körpers oder bald nach ihrer Entleerung. Doch verläuft die

Gerinnung meist zögernd und verschleppt, verglichen mit der des Blutes. Offenbar findet sich in den meisten Exsudaten ziemlich wenig Thrombokinase. Dementsprechend beschleunigt Zusatz von Gewebssaft die Gerinnung in hohem Grade. Spontan scheiden die Exsudate um so schneller Fibrin aus, je zellreicher sie sind.

Es gibt aber auch seröse Flüssigkeiten, die überhaupt nicht spontan gerinnen, sich auch auf Zusatz von Kalksalzen und Gewebssaft nicht verändern, sondern nur durch Thrombin zur Koagulation gebracht werden. Solche Transsudate sind nicht gerade häufig. Das perikardiale Transsudat des Pferdes zeigt diese Eigentümlichkeit (*A. Schmidt*[1], *Arthus*[2]). Auch der menschlichen Hydrokeleflüssigkeit können, allerdings nicht in allen Fällen, alle Fermentvorstufen fehlen. Sie gerinnt also nur noch auf Thrombinzusatz und entspricht in ihren Eigenschaften am meisten einer guten, nach *Hammarsten* dargestellten Fibrinogenlösung. Der Angabe *Mellanbys*, daß jede Hydrokeleflüssigkeit durch Gewebssaft zur Gerinnung gebracht werden kann, möchte ich die Befunde *A. Schmidts* sowie einzelne eigene Beobachtungen gegenüberstellen.

Will man einen zuverlässigen Indikator für Thrombin haben, so kann man sich solcher Transsudate bedienen. Immerhin scheint eine Fibrinogenlösung dem Zweck besser zu entsprechen. Denn kleine Thrombinmengen sind bisweilen in Transsudaten wirkungslos. Diese enthalten offenbar unbekannte gerinnungshemmende Körper, die die Wirkung kleiner Thrombinmengen (z. B. einiger Tropfen Blutserum) zu paralysieren vermögen.

B. Plasmata, deren Stabilität durch Neutralsalze bedingt ist.

Alle Neutralsalze können in genügender Konzentration die Blutgerinnung hemmen oder verzögern. Man bedient sich dieser Tatsache vielfach zur Gewinnung von Fibrinogenlösungen, die zum Nachweis gerinnungsbefördernder Substanzen geeignet sind. Nach *Buglia*[3] ist die gerinnungshemmende Wirkung von der Ionenkonzentration abhängig. Wenig ionisierte Salze sind schwach wirksam.

Für praktische Zwecke kommen nur Salze der Alkalien und alkalischen Erden in Frage. Salze der Schwermetalle sind zwar auch wirksam, aber der Vorgang ist irreversibel. Echte Fibringerinnung läßt sich in diesen Lösungen nicht mehr erzielen.

1. Die kalkfällenden Salze.

Oxalate, Fluoride und Zitrate hemmen schon in sehr geringer Konzentration die Gerinnung. Das ist verständlich, da ionisierte Kalksalze für die Bildung des Thrombins unerläßlich sind (s. S. 224). Durch die kalk-

[1]) *A. Schmidt*, Zur Blutlehre. Leipzig 1892.

[2]) *Arthus*, Le transsudat péritonéal du cheval contient-il un Profibrinferment? C. r. Soc. Biol. T. 56. S. 388 (1901).

[3]) *Buglia*, Azioni anticoagulante dei cationi etc. Arch. di fisiol. Vol. 3. cit. n. *L. Loeb*, Bioch. Cbl. VI. 1907. S. A.

fällenden Salze wird also vor allem die Entstehung des Thrombins, erst in zweiter Linie die Wirkung des fertigen Fibrinfermentes gehemmt. Zitronensaures Natron wirkt zwar nicht kalkfällend (*A. Schmidt*[1], *Pekelharing*[2]), hebt aber nach *Sabbatani*[3]) die Ionisierung der Kalksalze auf. Damit ist aber die Bedingung für das Flüssigbleiben des Blutes gegeben.

Ein Zusatz von 1‰ Natriumoxalat genügt, Blut ungerinnbar zu machen (*Arthus* und *Pagès*[4]). Man fängt also das aus den Gefäßen strömende Blut in 1/10 Volumen 1—2% Natriumoxalatlösung auf. Das auf diese Weise gewonnene **Oxalatblut**, respektive **-plasma** gerinnt nicht spontan, wohl aber auf Zusatz genügender Thrombinmengen sowie bei Kalkzusatz. Gewebssäfte können im Oxalatplasma keine Gerinnung bewirken.

Immerhin ist Oxalatplasma kein sehr gutes Reagenz auf Thrombin. Geringe Thrombinmengen bleiben häufig überhaupt ohne Wirkung. Bisweilen bilden sich aber, ähnlich wie im Fluoridplasma, auf Serumzusatz nur partielle Gerinnungen. Nur zum geringsten Teil dürfte diese Erscheinung auf eine direkte gerinnungshemmende Wirkung der Oxalate zu beziehen sein. Wahrscheinlich liegen auch noch andere Momente vor, denen man auch in Hydrokeleflüssigkeiten (s. S. 257) begegnet. Ob es sich hier um echte Antikörperwirkungen oder um Adsorptionserscheinungen handelt, ist noch nicht sicher bekannt.

Oxalatplasma gerinnt regelmäßig auf Zusatz löslicher Kalksalze, z. B. Kalziumchlorid, wenn man deren Menge so wählt, daß nur ein geringer Überschuß von Kalziumchlorid im Plasma entsteht. Stärkere Kalziumkonzentrationen wirken hemmend (0·6—1% $CaCl_2$). Aber selbst wenn man den Kalkzusatz richtig berechnet, verläuft die Gerinnung doch oft ziemlich zögernd. Das liegt daran, daß ein Teil der Fermentvorstufen von dem oft voluminösen Ca-Oxalatniederschlag zu Boden gerissen wird. Nach *Rettger* (l. c.) kann man das dadurch vermeiden, daß man Oxalatplasma längere Zeit gegen eine kalkfreie, 0·9%ige Kochsalzlösung dialysiert. Das Plasma bleibt füssig. Geringe Spuren von Kalksalzen rufen aber eine schnell verlaufende, typische Gerinnung hervor. Das Prothrombin, respektive die Fermentvorstufen bleiben im Oxalatplasma mehrere Tage erhalten.

Das **Fluoridplasma** wird nach *Arthus* durch Auffangen von Blut in einer Lösung von Natriumfluorid gewonnen. Die Konzentration des Salzes muß etwa 2‰ betragen. Sonst wird die Gerinnung nicht völlig unterdrückt. Natriumfluorid besitzt also trotz erheblich niedrigeren Molekulargewichts (42) schwächere gerinnungshemmende Eigenschaften als Natriumoxalat (152). Nach *Sabbatani* ist die Ca-fällende Kraft eines Grammoleküls NaFl viermal schwächer, als die eines Grammoleküls Natriumoxalat.

[1]) *Schmidt*, Weitere Beiträge zur Blutlehre. Wiesbaden 1895.

[2]) *Pekelharing*, Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam 1892.

[3]) *Sabbatini*, Fonction biologique du calcium. Arch. ital. de Biologie. T. 39. p. 341 (1903).

[4]) *Arthus* und *Pagès* l. c.

Fluornatriumplasma bleibt ebenso wie Oxalatplasma flüssig, weil es keine Ca-Ionen enthält. Immerhin unterscheidet es sich von diesem doch nach einigen Richtungen: Stellt man sich nämlich in der gewöhnlichen Weise, durch Halbsättigung mit Kochsalz, aus Fluornatriumplasma eine Fibrinogenlösung her und läßt diese gegen kalkfreie 0·9⁰/₀ige Kochsalzlösung dialysieren, so tritt in der Fibrinogenlösung alsbald Gerinnung ein (*Rettger* [1]). Mit Oxalatplasma gelingt der Versuch nicht. Natriumfluorid beeinflußt daher wahrscheinlich die Kalksalze des Plasma in anderer Weise als das Oxalat. Offenbar wird der Kalk nicht vollständig gefällt, sondern bleibt zum Teil in nicht ionisierter Form in Lösung, nach *Rettger* in loser Bindung mit den Fluoriden. Dialyse kann diese Bindung, an der sich vielleicht auch Eiweißkörper beteiligen, sprengen; es tritt dann prompte Gerinnung ein, ohne daß man Kalk zusetzen muß.

Fügt man dem Fluoridplasma Chlorkalzium in solcher Menge hinzu, daß alles Fluornatrium ausgefüllt wird und ein leichter Kalküberschuß im Plasma entsteht, so erfolgt, ganz im Gegensatz zum Verhalten des Oxalatplasma, meist doch keine Gerinnung. Diese Beobachtung ist verschieden gedeutet worden. Die von *Arthus* gegebene Erklärung lautet folgendermaßen: Fluorsalze hemmen die Gerinnung auf zweierlei Weise. Erstens analog den Oxalaten durch Bindung der Kalksalze, zweitens aber auch durch Beeinflussung der geformten Elemente des Blutes. Diese sollen durch die toxische Wirkung des $NaFl$ verhindert werden, gerinnungsbefördernde Substanzen an das Plasma abzugeben. Das Fluoridplasma soll also kein oder nur wenig Prothrombin, speziell Thrombokinase enthalten. Anders deuten *Bordet* und *Gengou* [2]) diese Erscheinung. Setzt man die berechnete Menge $CaCl_2$ zu Fluoridplasma, so entsteht ein massiger Niederschlag, der nicht allein aus $CaFl_2$ besteht, sondern auch Eiweiß, speziell Fibrinogen, sowie Thrombokinase zu Boden reißt. Dadurch soll sich die Ungerinnbarkeit des Plasma erklären.

Nach *Nolf* (l. c.) ist das mit Kalk versetzte, an sich ungerinnbare Fluornatriumplasma (le plasma fluoré recalcifié) das beste Reagenz auf Thrombozym (Thrombokinase). Es enthält Fibrinogen und Thrombogen und unterscheidet sich durch seinen reichlichen Thrombogengehalt von einer nach *Hammarsten* bereiteten Fibrinogenlösung. Der richtige $CaCl_2$-Zusatz wird am besten durch Berechnung ermittelt. Oder man setzt so lange $CaCl_2$-Lösung tropfenweise hinzu, als sich noch Niederschlag bildet. Dieser wird abgeschleudert.

Neuerdings hält *Rettger* diese Beobachtungen am Fluoridplasma für unzutreffend. Bei sorgfältiger Vermeidung jedes Ca-Überschusses soll es ganz gut gelingen, auch Fluoridplasma durch Kalkzusatz zur Gerinnung

[1]) *Rettger*, The coagulation of blood. Amer. Journ. of Physiol. XXIV. 1. Juli. p. 406 (1909).

[2]) *Bordet* et *Gengou*, Rech. sur la coagulation du sang. 3ᵉ mém., Contribution à l'étude du plasma fluoré. Annal. de l'Instit. *Pasteur*. T. 18 p. 26—40 (1904).

zu bringen. Also muß das Fluoridplasma erstens alle zur Gerinnung nötigen Faktoren enthalten. Zweitens kann aber der Fluoridniederschlag diese Substanzen offenbar auch nicht vollständig zu Boden reißen respektive immobilisieren.

Die Eigenschaften des Natriumfluoridplasma sind also noch nicht vollständig geklärt. Seine Stabilität verdankt es jedenfalls in erster Linie dem Kalkmangel.

Gegen die Verwendung des Fluornatriumplasma als qualitatives und quantitatives Reagenz auf Thrombin (*Arthus*[1]) sprechen früher erörterte Gründe (vgl. S. 258).

Das Zitratplasma wird durch Auffangen von Blut in einer Lösung von Natriumzitrat gewonnen. Die Konzentration dieses Salzes muß 4°/₀₀ betragen, damit das Blut sicher flüssig bleibt. Es erfolgt kein Niederschlag von Ca-Zitrat. Trotzdem ist das Ca gebunden und für die Fermentbildung nicht verfügbar. Das Zitratplasma findet neuerdings oft bei Immunitätsuntersuchungen Verwendung.

2. Andere Neutralsalze.

Die gerinnungshemmende Wirkung der meisten nicht kalkbindenden Salze beruht, wie schon *A. Schmidt* feststellte, auf der Fähigkeit der Neutralsalze in genügender Konzentration die Fermentbildung zu unterdrücken. Die Wirkung fertigen Thrombins wird erst bei sehr starker Salzkonzentration paralysiert.

Das Magnesiumsulfatplasma (*A. Schmidt*). $2^1/_2$—3 Volumina Blut werden in 1 Volumen schwefelsaurer Magnesialösung von 28°/₀ aufgefangen. Die Mischung wird sofort tüchtig durchgeschüttelt und zentrifugiert. Das zellfreie Magnesiumsulfatplasma kann entweder in dieser Form wochenlang im Eisschrank aufgehoben werden (*Wohlgemuth*[2]), oder man kann es nach *A. Schmidt* schnell über Schwefelsäure trocknen und pulverisieren. Das Pulver behält seine Brauchbarkeit beliebig lange. Zum Versuch wird die erforderliche Menge Pulver in einem Reagenzglase mit dem siebenfachen Gewicht Wasser durchgeschüttelt und nach einigen Stunden vom Ungelösten abzentrifugiert respektive abfiltriert.

Das auf die eine oder andere Weise gewonnene Magnesiumsulfatplasma gerinnt aus sich selbst heraus nicht mehr, obwohl es alle zur Gerinnung nötigen Faktoren enthält. In der angegebenen Konzentration unterdrückt das Salz meist auch die Wirkung zugesetzten freien Thrombins. Erst wenn man das Salzplasma hinreichend verdünnt, kommt zugesetztes Thrombin zur Wirkung. Nach *Wohlgemuth* (l. c.) genügt schon eine geringe Verdünnung ($1\,cm^3$ Wasser auf $2\,cm^3$ Salzplasma), um durch Zusatz von

[1]) *Arthus*, Un réactif quantitatif du Fibrinferment. Journ. de Physiol. T. 4. p. 1. (1902).

[2]) *Wohlgemuth*, Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Fibrinferments etc. Biochem. Zeitschr. Bd. 27. S. 79 (1910).

Fibrinferment respektive Serum Gerinnung zu erhalten. Von selbst gerinnt das verdünnte Magnesiumsulfatplasma nicht. Bisweilen bleibt es sogar bei einer Verdünnung mit der zehnfachen Wassermenge flüssig. Nach *A. Schmidt* ist man nicht imstande, ganz bestimmte quantitative Angaben über die jeweils zweckmäßige Verdünnung des Salzplasma zu machen. Sie hängt sehr von der Tierspezies ab. *Schmidt*, der meist mit Pferdeblut arbeitete, verdünnte das Plasma auf das achtfache, um einen brauchbaren Indikator für Thrombin zu gewinnen. In *Wohlgemuths* Versuchen (Blut von Kaninchen und Hund) genügten schon viel geringere Zusätze. In jedem Falle wird man also den optimalen Grad der Verdünnung festzustellen haben, d. h. den Grad, bei dem das Plasma auf Fermentzusatz schnell gerinnt, spontan aber flüssig bleibt. Mäßig verdünntes Salzplasma kann außer durch Thrombin auch noch durch zymoplastische Substanzen zur Gerinnung gebracht werden.

Magnesiumsulfatplasma dient also als Reagenz auf Thrombin, eventuell auch auf zymoplastische Substanzen. Es kann auch, ebenso wie Oxalatplasma, das Ausgangsmaterial zur Herstellung von Fibrinogenlösungen bilden. Das Fibrinogen wird zunächst durch völlige Sättigung mit $MgSO_4$ niedergeschlagen, der Niederschlag dann weiter nach der S. 253 angegebenen Methode *Hammarstens* verarbeitet. Praktischer ist es aber wohl, vom Oxalatplasma auszugehen.

Das Kochsalzplasma (*Bordet-Gengou*[1]). 15 cm^3 Blut werden in 5 cm^3 20%iger Kochsalzlösung aufgefangen, die Blutsalzmischung wird zentrifugiert. Das 5%ige Salzplasma hält sich lange ohne zu gerinnen oder seine sonstigen Eigenschaften zu ändern. Verdünnt man das Salzplasma mit destilliertem Wasser auf das vierfache, so gerinnt es in $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden spontan, bei Zusatz von Thrombin schon bei geringeren Verdünnungen. Es enthält selbst zunächst kein Thrombin, sondern nur dessen Vorstufen, verhält sich also genau wie Magnesiumsulfatplasma.

Die beiden eben erwähnten Plasmaarten empfehlen sich besonders wegen der Leichtigkeit ihrer Gewinnung für Gerinnungsversuche. Immer sind dann aber die optimalen Verdünnungen genau festzustellen, sonst bekommt man keine zuverlässigen Befunde.

Das Gallensalzplasma. Gallensalze wirken in vitro gerinnungshemmend, und zwar durch denselben Mechanismus, wie die übrigen Neutralsalze, nur in viel geringerer Konzentration. Läßt man Hundeblut in Rindergalle strömen, so bleibt bei einem Verhältnis von 1 Teil Galle zu 5 Teilen Blut jede Gerinnung aus, bei einem solchen von 1 : 10 bis 1 : 15 ist die Gerinnung mehr oder weniger verzögert. Unter 1 : 20 ist keine deutliche Verzögerung mehr nachweisbar. Stärker gerinnungshemmend wirken cholsaure Salze (z. B. die *Platner*sche Galle). Bei einem Zusatz von 1% bleibt die Gerinnung oft ganz aus, ist aber immer stark verzögert.

[1]) *Bordet* et *Gengou*, Rech. sur la coagul. du sang. Annal. de l'Instit. *Pasteur*, T. **17**. p. 822 (1903).

Ungerinnbares Gallensalzplasma enthält kein fertiges Thrombin, wohl aber dessen Vorstufen. Schon bei mäßiger Verdünnung mit Wasser erlangt es die Fähigkeit der Koagulation wieder. Nach Ausfällung der Kalksalze durch Natriumoxalat ist die nachfolgende Verdünnung unwirksam, das Plasma bleibt flüssig.

Gallensalze wirken stark hämolytisch. Doch ist ihre gerinnungshemmende Eigenschaft nicht auf Hämolyse zu beziehen; denn sie läßt sich auch in blutkörperchenfreien Fibrinogenlösungen demonstrieren.

Für die Erklärung cholämischer Blutungen im Organismus, die oft mit einer erheblichen Verminderung der Gerinnbarkeit einhergehen, kommt sicher nicht eine direkte gerinnungshemmende Wirkung der im Blute Leberkranker kreisenden Gallenbestandteile in Frage (*Morawitz* und *Bierich*[1]).

Gallensalzplasma ist im ganzen kein guter Indikator für Thrombin oder dessen Vorstufen, da es gar zu leicht schon bei mäßiger Verdünnung spontan zu gerinnen pflegt, ganz im Gegensatz zum Magnesiumsulfatplasma.

C. Methoden zur Gewinnung möglichst unveränderten, stabilen Blutplasmas.

Da Blutplasma in vitro meist starke Neigung zur Gerinnung zeigt, sind besondere Vorsichtsmaßregeln zur Gewinnung möglichst unveränderten Plasmas erforderlich, eines Plasmas, das keinen gerinnungshemmenden Zusatz erhält. Besonders geeignet erweist sich hier Blutplasma von Vögeln und niederen Wirbeltieren. Dieses ist, wie *Delezenne*[2]) zuerst zeigte, unter gewissen Bedingungen viel stabiler als Säugerblut. Aber auch aus diesem kann man ziemlich stabile Plasmata herstellen, die besonders früher vielfach für Gerinnungsversuche Anwendung fanden.

1. Zellfreies Pferdeblutplasma nach *A. Schmidt*.[3])

Das Plasma wird durch Abkühlung und Filtration gewonnen. Nur Pferdeblut ist geeignet. Das Blut anderer Tiere hat einmal eine zu starke Gerinnungstendenz. Dann sedimentieren aber auch alle anderen Blutarten zu langsam und unvollständig, während sich die Blutzellen gerade im Pferdeblut besonders schnell und vollständig absetzen.

Pferdeblut wird in hohen, vorher sorgfältig gekühlten Glaszylindern aufgefangen. Sie stehen in Eis oder in einer Kältemischung. Das Blut kühlt sich rasch ab und bleibt flüssig. Sobald seine Temperatur auf etwa 0° gesunken ist und die geformten Elemente sich abgesetzt haben, wird das Plasma vorsichtig dekantiert und auf ein Filter aus einer dreifachen Lage Filtrierpapier gebracht (Papier von *Schleicher & Schüll*, Nr. 598). Das

---

[1]) *Morawitz* und *Bierich*, Über die Pathogenese der cholämischen Blutungen. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. Bd. 56. S. 115 (1906).

[2]) *Delezenne*, Rech. sur la coagulation du sang chez les oiseaux. Arch. de Physiol. T. 9. p. 333—352 (1897).

[3]) *A. Schmidt*, Zur Blutlehre. Leipzig 1892. S. 7.

Filter befindet sich in einem Doppeltrichter, der mit einer Kältemischung gefüllt ist. Man hat nun die Aufgabe, auch während des Filtrationsprozesses die Temperatur des Plasmas nicht über + 0·5° steigen und andrerseits nicht viel unter den Gefrierpunkt sinken zu lassen. Im ersteren Falle gehen zu viele Blutzellen (hauptsächlich Blutplättchen und Leukozyten), die sich noch nicht abgesetzt hatten, durch das Filter, im anderen Falle gerät die Filtration ins Stocken. Außerdem löst sich ein Teil der Blutzellen während des Gefrierens auf; es gelangen dann Zellbestandteile in das Plasma und wirken gerinnungserzeugend. Hat man solche Zwischenfälle vermieden, so bleibt das zellfreie Plasmafiltrat selbst bei einer Temperatur von 15° oft viele Stunden lang, ausnahmsweise sogar 24 Stunden flüssig und kann zu Gerinnungsversuchen verwandt werden. Niemals erhält man aber Plasma, das spontan gar keine Neigung zur Gerinnung zeigt. Je intensiver die Gefrierung im Filter war, je mehr Zellen durch das Filter durchgegangen sind, um so größer ist die Gerinnungstendenz. Es ist gut, die Filtration in einem kühlen Raume vorzunehmen.

Im Laufe einer Stunde erhält man bis 50 cm^3 Filtrat, oft aber nur viel weniger. Hoher Filtrationsdruck ist erforderlich. Daher geht man zweckmäßig von großen Plasmamengen aus.

Auf jeden Fall bleibt die Gewinnung des abgekühlten, zellfreien Plasma schwierig. Auch kann ich nicht glauben, daß es als Indikator für Thrombin und seine Vorstufen viel leistet. Die Stabilität ist ja keine absolute, außerdem ist sie großen Schwankungen unterworfen.

2. Stabiles Säugerplasma in paraffinierten Gefäßen (*Bordet-Gengou*[1]).

Da die Berührung mit benetzbaren Fremdkörpern den ersten Anstoß zur Gerinnung gibt, kann Auffangen von Blut unter Öl (*Freund*[2]) oder noch besser in paraffinierten Gefäßen, in denen jede Möglichkeit der Benetzung ausgeschlossen ist, die Gerinnung erheblich behindern oder hintanhalten.

Man versieht zunächst eine Anzahl sorgfältig gereinigter Zentrifugengläser innen mit einem Überzug sauberen und sterilen Paraffins. Paraffin von niedrigem Schmelzpunkte ist vorzuziehen. Sonst macht man die Erfahrung, daß eine sehr spröde Paraffinschicht doch einer gewissen Benetzung mit Blut zugänglich ist. Eine Mischung von festem Paraffin mit Paraff. liquidum ist am meisten zu empfehlen. Der Schmelzpunkt liege nur wenig über 40°. Vaseline oder Öl ist nicht recht brauchbar, da es während des Zentrifugierens leicht von den Wänden des Glasgefäßes abgleitet. Die Zentrifugiergläschen sind sorgfältig vor dem Eindringen von Staub zu schützen, am besten durch Bedecken mit Stanniol, das man auch beim Zentrifugieren als Deckel auf den Gläsern beläßt. Auch die zur Blut-

---

[1]) *Bordet-Gengou*, l. c. S. 261.

[2]) *Freund*, Ein Beitrag zur Kenntnis der Blutgerinnung. Wiener med. Jahrb. 46—48 (1886).

entnahme dienende Glaskanüle sowie die sich anschließenden Glas- und Gummirohre müssen mit einem Paraffinüberzug versehen werden.

Man befestigt nun die Kanüle auf die gewöhnliche Weise in einer der Arterien des Versuchstieres, läßt die zuerst ausfließenden Blutmengen abtropfen und füllt dann schnell die Gläser, die sofort wieder zugedeckt und zentrifugiert werden. Ist kein Fehler passiert, hat man speziell jedes Eindringen von Staub u. dgl. zu vermeiden gewußt, so tritt keine Gerinnung ein. Man kann nach kurzer Zeit das zellfreie Plasma mit einer paraffinierten Pipette abheben.

Dieses Plasma hält sich nur so lange flüssig, als es in paraffinierten Gefäßen verweilt. In gewöhnlichen Glasgefäßen wird es regelmäßig mit größerer oder geringerer Geschwindigkeit fest. Es enthält also alles, was zur Gerinnung erforderlich ist. Trotzdem entsteht in ihm doch erst dann Thrombin, wenn eine Kontaktwirkung benetzbarer Fremdkörper gegeben ist.

Zur Ausführung von Gerinnungsversuchen ist dieses Plasma seiner geringen Stabilität wegen wenig geeignet. Größere Übung und sorgfältige Technik ist außerdem Vorbedingung für die Gewinnung des Plasma in Paraffinröhrchen.

3. Vogelplasma nach *Delezenne.*[1])

Vogelblut und Blut niederer Wirbeltiere zeichnet sich durch größere Stabilität in vitro vor dem Säugerblute aus.

Es gelingt Vogelblut nach einem von *Delezenne* angegebenen Verfahren ohne jeden gerinnungshemmenden Zusatz lange Zeit außerhalb des Körpers flüssig zu erhalten und durch die Zentrifuge ein zellfreies Vogelplasma zu gewinnen, das nur wenig oder überhaupt keine Neigung zur Koagulation aufweist. Am besten macht man den Versuch mit Gänsen oder Truthähnen. Hühner sind wegen der kleineren Verhältnisse weniger geeignet. Auch habe ich einige Male die Beobachtung gemacht, daß Hühner schon beim Aufbinden auf das Operationsbrett oder beim ersten Hautschnitt plötzlich starben (Shokwirkung?).

Nach *Fuld*[2]) verfährt man zur Gewinnung von Vogelplasma in folgender Weise: Das Blut wird aus der Karotis entnommen, von der man ein längeres Stück freilegen kann als von der Brachialis. Das Tier wird ohne Narkose — der Eingriff ist kaum schmerzhaft — aufgebunden und durch einige untergeschobene Keile gestützt. Der Hals soll möglichst gerade und unverdreht liegen. Nun reinigt man das Operationsfeld von Federn (am besten durch Rupfen) und durchtrennt die Haut in der Mittellinie, wobei es meist zu kleinen Blutungen aus Hautvenen kommt. Diese werden gestillt, bevor man weiter geht. Nun geht man möglichst stumpf, scharf in der Mittellinie, zwischen den Muskeln in die Tiefe, ohne den Puls zu suchen. Ist man bis auf die ziemlich tief gelegene linke Arterie

[1]) *Delezenne*, l. c. S. 262.

[2]) *Fuld*, Über das Zeitgesetz des Fibrinferments. *Hofmeisters* Beitr. Bd. 2. S. 514 (1902).

gekommen, so tritt diese deutlich aus der Wunde hervor. Das rechte Gefäß liegt unmittelbar dahinter. Man legt das Gefäß nun auf einen Streifen Fließpapier und bindet in gewöhnlicher Weise eine absolut saubere Glaskanüle ein. Nun wird das Blut in Zentrifugengläschen aufgefangen, die mit einem reichlichen Stück Stanniolpapier bedeckt sind. Unmittelbar vor Gebrauch wird das Stanniol mit einem Rohr von der Weite der Gefäßkanüle durchstoßen. In diese Öffnung führt man die Kanüle ein, so daß man also das Stanniol auch beim Auffangen des Blutes nicht abzuheben braucht. Sofort nach Füllung des Gläschens mit Blut wird das Stanniolpapier verschoben und hierdurch wieder ein völliger Abschluß erzielt. Das Auswechseln der Gefäße geschehe schnell. Durch mehrmaliges Zentrifugieren und Abheben (jedes Glas mit einer frisch gereinigten Pipette) erhält man ein körperchenfreies, stabiles Plasma. Während des Zentrifugierens bleiben die Gläschen, respektive auch die Fächer der Zentrifuge mit Stanniol bedeckt.

Alle diese Vorsichtsmaßregeln sind bis zur völligen Entfernung der zelligen Elemente nötig. Bis dahin darf das Blut nur mit völlig staubfreien Gegenständen in Berührung kommen. *Fuld* rät, die Zentrifugengläschen und besonders auch die Pipetten, die zum Abheben des Plasmas dienen, vorher auszudämpfen. Ich habe mich mehrfach mit gutem Erfolge paraffinierter Gläser und Kanülen bedient. Das zellfreie Plasma ist viel weniger zur Gerinnung geneigt und kann — auch in nicht paraffinierten Glasgefäßen — unter Umständen wochenlang gehalten werden, ohne zu gerinnen. Sehr häufig erlebt man es aber doch, daß schon während des Zentrifugierens oder kurz danach eines oder das andere der Röhrchen partielle Gerinnung zeigt. Der noch nicht geronnene Plasmaanteil aus diesen Gefäßen darf nicht weiter verwendet werden. Gewöhnlich liegt hierbei ein Fehler der Technik vor, besonders Unsauberkeit eines der Glasgefäße, mit denen das noch zellenhaltige Plasma in Berührung kommt.

Außer der Karotis kommt für die Blutentnahme noch die Art. brachialis (im Sulcus bicipitalis internus des Flügels) oder die Vena jugularis respektive brachialis in Betracht. Die Blutentnahme aus der Vene — technisch einfacher als die aus der Karotis — ist vielleicht weniger zu empfehlen, da das Blut sich nur tropfenweise entleert und hierdurch die Möglichkeit der Verunreinigung durch Staubpartikel in höherem Grade gegeben ist.

Das ungerinnbare, zellfreie Vogelplasma ist kein guter Indikator für Thrombin. Ebenso wie die meisten anderen „natürlichen" Plasmaarten (Hydrokeleflüssigkeit, Oxalatplasma etc.) enthält es gerinnungshemmende Körper (*L. Loeb* [1]), *Muraschew* [2]). Zusatz von wenig Thrombin, z. B. Blutserum, ruft häufig nur langsam verlaufende oder unvollständige Gerinnungen hervor. Dagegen ist Gansplasma ein sehr gutes Reagenz auf Thrombokinase

[1]) *L. Loeb*, Versuche über einige Bedingungen der Blutgerinnung etc. *Virchows* Arch. Bd. **176**. S. A. (1904).

[2]) *Muraschew*, Über die Spezifizität des Fibrinferments und seiner Vorstufen Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **80**. S. 187. (1904).

respektive zymoplastische Substanzen. Eine Spur Gewebssaft genügt schon, das Plasma in wenigen Minuten zu vollständiger Gerinnung zu bringen. Das Gansplasma enthält also Thrombogen, Fibrinogen und Kalksalze. Es fehlt ihm an Thrombokinase oder diese ist doch nur in geringen Mengen vorhanden.

Gansplasma, das längere Zeit hindurch im Eisschrank aufbewahrt wurde, bleibt bisweilen auch auf Zusatz von Gewebssaft flüssig, obwohl es noch mit Thrombin gerinnen kann. Nach *Hewlett*[1]) handelt es sich möglicherweise um Unwirksamwerden des Thrombogens.

Aus sich selbst heraus (etwa durch Verdünnen mit Wasser, Durchleiten von CO_2 oder Neutralisieren) ist sorgfältig bereitetes Gansplasma nur schwer oder gar nicht zur Gerinnung zu bringen (im Gegensatz zu Peptonplasma).

4. Plasma niederer Tiere (Fische, Krustazeen).

Das Blut der Batrachier und Fische weist nach *Delezenne* (l. c.) ähnliche Eigentümlichkeiten auf, wie Vogelplasma, d. h. eine gewisse Stabilität in vitro, falls es unter Vermeidung jeden Kontaktes mit Geweben, Staub etc. entnommen wird. Ich gebe die Technik der Gewinnung von Fischplasma nach *Nolf*.[2])

Ein Katzenhai (Scyllium catulus) wird vertikal aufgehängt, mit dem Kopf nach unten. Man schneidet den Schwanz des Tieres in der Höhe der letzten Dorsalflosse ab. Es erfolgt trotz Eröffnung der Kaudalarterie keine Blutung, da der arterielle Druck, der sehr niedrig ist, durch die Körperlage ungefähr auf 0 reduziert wird. Nun führt man in die Arterie eine ganz saubere Glaskanüle ein. Sie wird tief in das Lumen des Gefäßes hineingestoßen und soll durch seitliche Kompression auch die darunterliegende, ebenfalls eröffnete Vene schließen. Die Umgebung der Arterienkanüle wird durch Wattetampons gut abgedeckt, um jede Beimischung von Gewebssaft zu vermeiden. Dann wird das Tier nach sorgfältiger Fixation der Kanüle in horizontale Körperhaltung gebracht und unter Einleitung künstlicher Respiration entblutet. Die ersten Blutstropfen läßt man ablaufen, die folgenden werden in paraffinierten Gefäßen aufgefangen und sofort zentrifugiert. Das dekantierte Plasma behält in paraffinierten Gefäßen seinen flüssigen Zustand unbegrenzt lange bei. In Glasgefäßen gerinnt es meist langsam im Gegensatze zu Gansplasma, das auch hier flüssig bleibt. Verdünnung mit Wasser befördert die Gerinnung des Fischplasma. Im übrigen verhält sich letzteres — besonders gegenüber Gewebssaft — ähnlich wie Gansplasma.

Bei Teleostiern ist die Tendenz zur spontanen Gerinnung größer, die Gewinnung eines stabilen Plasma weniger leicht.

[1]) *Hewlett*, Über die Einwirkung des Peptonblutes auf Hämolyse und Bakterizidie etc. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm. Bd. **49**. S. 307 (1903).

[2]) *Nolf*, La coagulation du sang des poissons. Arch. internat. de Physiol. Vol. **4**. S. A. (1906).

Blutplasma Wirbelloser. Einige der größeren Krustazeenarten liefern genügende Blutmengen. Es läßt sich bei ihnen ein Plasma ohne oder doch nur mit geringer Gerinnungstendenz gewinnen. Verfahren zur Gewinnung von Krustazeenplasma sind von *L. Loeb*[1]) und *P. Nolf*[2]) angegeben worden. Es mag hier erwähnt werden, daß manche Krustazeen zwar auch eine echte Fibrinogengerinnung haben wie Wirbeltiere, daß aber außerdem eine dieser Gerinnung vorhergehende Agglutination und Verklumpung der Amöbozyten des Blutes eine Art von erster Gerinnung darstellt, die für die spontane Blutstillung bei diesen Tieren bedeutungsvoll ist. Bei anderen Wirbellosen ist eine echte Fibringerinnung überhaupt nicht nachweisbar, z. B. bei Limulus. Dagegen ist die Agglutination der Amöbozyten ganz allgemein verbreitet. Bei der Languste (Palinurus vulgaris) und dem Hummer (Homarus vulgaris) tritt zu der Agglutination eine nachträgliche zweite Gerinnung, die viel Ähnlichkeit mit der Fibringerinnung der Wirbeltiere hat.

Blutentnahme bei der Languste (Palinurus vulgaris) nach *Nolf*. Man wählt große Tiere und entnimmt ihnen 30—60 cm^3 Blut durch Amputation eines Beines. Die Tiere vertragen den Eingriff gut und bleiben am Leben. Vor der Blutentnahme wird das dazu gewählte Bein (gewöhnlich das vorletzte) sorgfältig gereinigt und in Höhe des letzten Gelenkes abgeschnitten. Zuweilen tritt danach Autotomie ein. Das Blut entleert sich ziemlich schnell, falls keine stärkeren Muskelbänder in der Umgebung des Gefäßes liegen. Sonst kann es vorkommen, daß es sich durch Agglutination der Amöbozyten wieder schließt. Beim Hummer gewinnt man das Blut nach *L. Loeb* am besten durch Inzision ins Abdomen.

Da das Blut der Krustazeen in vitro meist ziemlich schnell nach der sogenannten ersten Gerinnung, der Agglutination der Amöbozyten, durch Ausscheidung des Fibrinogens ganz fest wird, so ist es notwendig, sich durch bestimmte Methoden ein stabiles, für Gerinnungsversuche brauchbares Plasma zu verschaffen.

Nach *L. Loeb* kann man zu diesem Zwecke in folgender Weise verfahren:

1. Hummerblut wird in destilliertem Wasser aufgefangen. Man wählt 1 Volumen Wasser für 2—4 Volumina Blut. Die Flüssigkeit wird filtriert. Das Plasma gerinnt aus sich selbst heraus nicht mehr, oder doch nur langsam.

2. Hummerblut wird während der Blutentnahme geschüttelt, um die Agglutination der Amöbozyten zu befördern, dann sogleich filtriert. Das Filtrat versetzt man mit Wasser im Verhältnis von 20 Teilen Blut zu 14 Teilen Wasser. Diese Mischung wird sofort eine halbe Stunde lang auf

[1]) *L. Loeb*, Über die Koagulation des Blutes einiger Arthropoden. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. V. S. 191 (1904). — Derselbe, Untersuchungen über Blutgerinnung Ebenda, VI. S. 260 (1905).

[2]) *P. Nolf*, La coagulation chez les crustacés. Arch. internat. de Physiol. Vol. 7. H. VI. S. A. (1909).

52° erwärmt. Die Lösung gerinnt aus sich selbst heraus nicht mehr, wohl aber auf Zusatz gerinnungsbefördernder Substanzen, z. B. Gewebssaft oder Extrakten aus Amöbozyten.

3. Endlich kann man aus Hummerblut auch eine Fibrinogenlösung herstellen. Das Blut wird wieder wie oben durch Schütteln von den Amöbozyten befreit — man erkennt die völlige Ausscheidung dieser Zellen an der Flockenbildung in der sonst klaren Flüssigkeit —, dann mit einem größeren Volumen gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Man fügt dem Gemisch Kochsalz in Substanz bis zur Sättigung hinzu (Berechnen der Menge!). Der nach 4—9 Stunden abfiltrierte Niederschlag wird in destilliertem Wasser gelöst. Diese Fibrinogenlösung ist haltbar, sie gerinnt nur auf Zusatz gerinnungsbefördernder Stoffe.

4. Nach *Noll* gelingt es auch, Langustenplasma ohne jeden Zusatz in der Weise zu erhalten, daß man Blut aus einem Hinterbein des Tieres (die ersten Tropfen soll man nicht verwenden!) in paraffinierten Gläsern auffängt, sofort zentrifugiert und das abgehobene zellfreie Plasma bei 0° aufhebt. Es bleibt unter diesen Bedingungen lange flüssig und gerinnt auch bei gewöhnlicher Temperatur erst in mehreren Stunden.

Die in verschiedener Weise gewonnenen Plasmata der Krustazeen gerinnen auf Zusatz von Gewebsextrakten oder Extrakten von Amöbozyten. Anwesenheit von Kalksalzen ist dabei erforderlich. Thrombin und Gewebssaft von Wirbeltieren sind in einer von Krustazeenplasma hergestellten Fibrinogenlösung unwirksam und vice versa. Weitere technische Einzelheiten finden sich bei *L. Loeb*.

D. Plasmata, deren Stabilität vornehmlich durch gerinnungshemmende Substanzen bedingt ist.

1. Das Peptonplasma.

Wittepepton verhindert zwar nicht in vitro, wohl aber bei intravenöser Injektion unter gewissen Bedingungen die Gerinnung (*Schmidt-Mühlheim*[1]), *Fano*[2]). Die Gerinnungsunfähigkeit dauert mehrere Stunden. Man wählt für den Versuch am besten Hunde oder Katzen. Die Tiere müssen zuvor 12—24 Stunden gehungert haben. Die Injektion der Peptonlösung erfolgt durch eine in die Vena iugularis eingebundene Kanüle (herzwärts!). Das Pepton wird in kochender Kochsalzlösung gelöst. Man stellt sich eine etwa 3—5%ige Peptonlösung her. Diese ist nach Abkühlung und Filtration zur Injektion verwendbar. Will man das Blut völlig ungerinnbar machen, so empfiehlt es sich, mindestens 0·3 *g* Pepton pro Kilogramm Tier zu injizieren. Lieber wählt man noch etwas höhere Dosen, doch nicht über 0·6 *g*. Sonst sind Todesfälle während oder kurz

[1]) *Schmidt-Mühlheim*, Zur Kenntnis des Peptons und seiner physiologischen Bedeutung. Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt. S. 33—56 (1880).

[2]) *Fano*, Über das Verhalten des Peptons und Tryptons zu Blut und Lymphe. Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt. S. 277—297 (1881).

nach der Infusion zu befürchten. Ferner geschehe die Injektion möglichst schnell. Spritzt man die gleiche Dosis langsam ein, so wird das Blut häufig nicht ganz ungerinnbar. Von der Peritonealhöhle aus sind sehr starke Gaben erforderlich, um überhaupt eine Änderung der Gerinnbarkeit zu bewirken.

Kaninchen und Meerschweinchen sind für Peptonversuche ungeeignet. Zuweilen bekommt man bei ihnen überhaupt keine Änderung der Gerinnungsfähigkeit, bisweilen sogar eine Beschleunigung. Eine sichere Peptonwirkung läßt sich hingegen wieder bei Vögeln beobachten. Auch diese läßt man am besten tags zuvor hungern.

Unmittelbar nach der Injektion werden die Tiere, falls sie nicht narkotisiert waren, somnolent, der Blutdruck sinkt stark, zuweilen setzen die Atembewegungen aus. Man muß dann zur künstlichen Respiration greifen. Todesfälle sind selten, falls man nicht sehr große Peptonmengen verwendet.

Das zirkulierende Blut wird schon kurz nach der Injektion ungerinnbar. Erst nach mehreren Stunden geht dieser Zustand allmählich vorüber. Gleichzeitig wird das Tier gegen die gerinnungshemmende Wirkung einer zweiten Peptoninjektion immun. (Pepton- oder Peptozymimmunität.) Die Immunität dauert nur wenig über 24 Stunden.

Ungerinnbares Blut, kurz nach der Injektion der Karotis entnommen, bleibt in vitro oft lange Zeit, zuweilen unbegrenzt lange flüssig. Ebenso verhält sich das Peptonplasma. Es läßt sich leicht durch Zentrifugieren gewinnen.

Das Peptonplasma hat zu vielen Untersuchungen über das Wesen der Gerinnung gedient (*Wooldridge*[1]), *Nolf* l. c.). Es enthält einen gerinnungshemmenden Körper, ein Antithrombin. Dieser wird unter dem Einflusse der Peptoninjektion in der Leber gebildet. Er kann zugesetztes Thrombin unwirksam machen. Daher gerinnt Peptonplasma nur schwer und langsam auf Zusatz fermenthaltigen Serums. Sonst finden sich im Peptonplasma alle zur Gerinnung nötigen Faktoren, also Fibrinogen, Kalksalze, Thrombogen und Kinase. Trotzdem reagieren sie aus noch unbekannten Gründen nur schwer oder doch nur auf bestimmte Reize miteinander. Berührung mit benetzbaren Fremdkörpern genügt nicht, es müssen andere zymoplastische Faktoren eingreifen. In diesem Sinne wirkt Verdünnen des Plasma mit destilliertem Wasser, Einleiten von CO_2, Neutralisation mit Essigsäure. Besonders wirksam ist Zusatz von Gewebssaft.

Nach *Nolf* ist das Peptonplasma das beste Reagenz auf „thromboplastische" Substanzen. Indessen sollte es doch nur mit Vorsicht Verwendung finden; seine Eigenschaften sind nicht konstant, auch liegen die Verhältnisse gerade hier sehr verwickelt.

Nicht jedes Pepton schlechthin, sondern nur bestimmte Sorten, besonders gerade das Pepton *Witte*, löst diese eigenartige Reaktion im

[1]) *Wooldridge*, Die Gerinnung des Blutes. Deutsch von *M. v. Frey*. Leipzig 1891

Organismus aus. Andere Albumosengemische sind vielfach wenig oder gar nicht wirksam.

Ähnlich wie Pepton wirkt eine Reihe anderer, scheinbar gar nicht zusammengehöriger Substanzen, die *Delezenne*[1]) unter dem Namen „Körper der Peptongruppe“ umschreibt. Dazu gehören: Aalserum, Krebsmuskel- und Schneckenextrakte und mannigfaltige Auszüge aus den Geweben niederer Tiere.

2. Hirudinplasma.

Durch Blutegelextrakt oder Hirudin läßt sich die Gerinnung aufheben resp. verzögern. Wirksame Extrakte erhält man durch Trocknen der in Alkohol konservierten Blutegelköpfe. Die Köpfe werden dann möglichst fein gepulvert und mehrere Stunden mit Wasser extrahiert (*Dickinson*[2]).

Das von *Jakobj* und *Franz*[3]) aus Blutegelköpfen hergestellte Hirudin (Firma *Sachse & Cie.*, Leipzig) ist ein sehr stark gerinnungshemmend wirkender Körper. Hirudin ist zurzeit sicher das beste Mittel, die Blutgerinnung im Organismus zum Zwecke physiologischer Versuche für längere Zeit aufzuheben. Denn es ist die einzige gerinnungshemmende Substanz, die relativ wenig toxisch ist. 1 *mg* Hirudin genügt in vitro und in vivo, um die Gerinnung von 5 *cm*³ Blut zu verhindern. Einer ausgedehnteren Anwendung, speziell auch bei größeren Tieren, steht nur der hohe Preis des Hirudins im Wege. (Ebenso, wie das *Krogh* [Skandin. Arch. f. Physiol. Bd. 20, 1908] getan hat, möchte auch ich an dieser Stelle darauf hinweisen, daß der Preis des Hirudins, einer Substanz, die ausschließlich wissenschaftlichen Zwecken dient, ganz unverhältnismäßig hoch ist. Hier sollten doch nicht allein rein kaufmännische Gesichtspunkte maßgebend sein!)

Auch in vitro ist Hirudin wirksam, sogar im trockenen Zustande als Pulver. Es ist also nicht erforderlich, Blut, dessen Gerinnung man hemmen will, in einer Hirudinlösung aufzufangen. Einige Körnchen trockenen Hirudins sind auch schon genügend.

Hirudin ist ein Antithrombin. Es neutralisiert eine bestimmte Menge Fibrinferment. Demgemäß gelingt es nur schwer, Hirudinplasma durch Fermentzusatz zur Gerinnung zu bringen. Ob das überhaupt möglich ist, hängt von der Menge des vorhandenen Hirudins ab, auch von der Stärke der Fermentlösung.

Gewebsextrakte können, falls der Hirudinzusatz nicht gar zu groß ist, ebenfalls das Plasma zur Gerinnung bringen. Offenbar erfolgt hierbei im Hirudinplasma eine massenhafte Thrombinbildung.

[1]) *Delezenne*, Wirkung des Aalserums und der Organextrakte auf die Blutgerinnung. Arch. de Physiol. p. 646 (1897).

[2]) *Dickinson*, Notiz über den Blutegelextrakt und seine Wirkung auf das Blut. Journ. of Physiol. 11. p. 566 (1890).

[3]) *Franz*, Über den die Blutgerinnung aufhebenden Bestandteil des medizinischen Blutegels. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **49**. S. 342 (1903).

E. Quantitative Bestimmung des Fibrinogens.

Die Schwierigkeit einer exakten quantitativen Bestimmung des Fibrinogens liegt in der Trennung dieses Eiweißkörpers von den anderen Globulinen, die ähnliche Eigenschaften haben. Folgende Methoden sind heute im Gebrauch:

1. Bestimmung des Fibrinogens durch Wägen des daraus gebildeten Fibrins. Die Resultate dieser Methode sind wahrscheinlich recht unsicher. Denn abgesehen davon, daß der Übergang von Fibrinogen in Fibrin wohl kein quantitativer ist (vgl. *Hammarsten*[1]), *Heubner*[2]), *Huiskamp*[3]), dürfte es schwer sein, das Fibrin von all seinen Einschlüssen, von allen mitgerissenen Substanzen nachträglich zu befreien. Auch die Fibrinolyse kann bei längerem Waschen mit Salzlösungen Fehler bedingen.

2. Die Methode der fraktionierten Hitzekoagulation wurde zuerst von *Frédéricq*[4]) geübt. Die Koagulationstemperatur liegt unter der anderer Globuline. *Frédéricq* schlägt vor, Bittersalzplasma 15 Minuten lang auf 60° zu erwärmen und die ausgeschiedenen Gerinnsel zu wiegen. Leider ist die Gerinnung bei der genannten Temperatur nach *Hammarsten* unvollständig. Die Methode gibt zu niedrige Werte.

3. Bestimmung des Fibrinogens durch Fällung mit Essigsäure (*Doyon*, *Morel*, *Péju*[5]). Als Material dient Natriumfluoridplasma. Dieses wird mit verdünnter Essigsäure versetzt, und zwar auf 12 cm^3 Plasma 1 cm^3 der Essigsäurelösung. Der Niederschlag wird abfiltriert, koaguliert, gewaschen, getrocknet und gewogen. Die Werte sollen denen entsprechen, die man durch Hitzekoagulation oder nach der später zu beschreibenden *Reye*schen Methode erhält. Mir erscheint es wenig vorteilhaft, an ganz unverdünntem Plasma zu arbeiten. Denn die mitgerissenen Anteile, die den anderen Globulinen entstammen, sind um so größer, je stärker die Konzentration der Eiweißlösung ist.

4. Salzfällungsmethode nach *Reye*[6]) (resp. nach *Porges* und *Spiro*[7]). Die Methode geht von der Tatsache aus, daß Fibrinogen durch Neutralsalze leichter ausgesalzen wird als die anderen Globuline.

Blut wird in 3%iger Lösung von NaFl aufgefangen. Man wählt Menge der Lösung und des Blutes so, daß in diesem eine Fluornatriumkonzen-

---

[1]) *Hammarsten*, Über den Faserstoff und seine Entstehung aus dem Fibrinogen. *Pflügers* Arch. Bd. **30**. S. 437 (1883).

[2]) *Heubner*, Die Spaltung des Fibrinogens bei der Fibringerinnung. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. Bd. **49**. S. 229 (1903).

[3]) *Huiskamp*, Zur Fibringlobulinfrage. Zeitschr. f. physiol Chemie. Bd. **44**. S. A. (1905).

[4]) *Frédéricq*, Untersuchungen über die Konstitution des Blutplasmas. Gand, Paris, Leipzig 1878.

[5]) *Doyon*, *Morel*, *Péju*, Procédés de dosage du fibrinogène. C. rend. soc. biol. T. **58**. p. 657 (1905).

[6]) *Reye*, Über Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. I.-D. Straßburg 1898.

[7]) *Porges* u. *Spiro*, Die Globuline des Blutserums. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **3**. S. 277 (1903).

tration von 0·56—0·6% besteht. Zu 2 *cm*³ dieses Plasma setzt man aus einer Bürette gesättigte neutrale Ammonsulfatlösung, deren Dichtigkeit bei 19° 1·245 betragen soll. Nach Zusatz der Salzlösung füllt man die Plasma-Salzmischung mit destilliertem Wasser auf 10 *cm*³ auf und läßt einige Stunden stehen. Das Fibrinogen beginnt bei Zusatz von 1·5—1·7 *cm*³ Ammoniumsulfat auszufallen. Die Fällung ist bei 2·5—2·7 *cm*³ beendet, falls man 2 *cm*³ Plasma nimmt und immer auf 10 *cm*³ auffüllt. Bei 2·8 *cm*³ Ammoniumsulfatzusatz beginnt schon die Fällung der Globuline. Daher ist bei Verwendung der Methode zur quantitativen Fibrinogenbestimmung vor allem eine Kollision mit der Globulinfällung zu vermeiden. Das geschieht am besten, wenn man das Plasma, wie oben angegeben, auf das 5fache verdünnt. Im unverdünnten Plasma geht die obere Grenze der Fibrinogenfällung in die untere der Globulinfraktion ohne Grenze über.

Im Serum finden sich sehr geringe Mengen eines Eiweißkörpers mit den Salzfällungsgrenzen des Fibrinogens. 2 *cm*³ Serum geben nämlich bei Zusatz von 2·2—2·9 *cm*³ Ammonsulfat und nachfolgender Auffüllung auf 10 *cm*³ Gesamtflüssigkeit Trübung und feine flockige Ausscheidung. Wahrscheinlich handelt es sich hier um das *Hammarsten*sche Fibringlobulin.

Reye empfiehlt schließlich folgendes einfachere Verfahren: Je 12 *cm*³ klaren Fluornatriumplasmas werden mit je 30 *cm*³ destillierten Wassers verdünnt, mit je 16 *cm*³ Ammonsulfatlösung gefällt und bis zum Absetzen des Niederschlages stehen gelassen. Man bringt dann die flockigen Ausscheidungen auf ein gewogenes Filter, wäscht mit entsprechend verdünnter Ammonsulfatlösung so lange nach, als das Filtrat noch Eiweißreaktion gibt. Dann wird der Niederschlag an der Luft getrocknet und bei 80° im Trockenofen koaguliert. Der jetzt unlöslich gewordene Niederschlag wird mit heißem Wasser schwefelsäurefrei gewaschen, dann mit Alkohol und Äther behandelt, zuletzt bei 100° getrocknet und gewogen.

In 12 *cm*³ Rinderplasma findet *Reye* 0·042—0·0424 *g* Fibrinogen, was einem mittleren Prozentgehalt des Plasma von 0·3479 entspricht.

Das Auswaschen des Ammonsulfats aus dem Niederschlag ist zeitraubend. *Porges* und *Spiro* haben die Methode dadurch sehr vereinfacht, daß sie N-Bestimmungen vor und nach Ausfällung des Fibrinogens im Plasma vornehmen. Das Fibrinogen wird also überhaupt nicht gewogen, sondern aus der Differenz berechnet. Natürlich ist kein Ammonsulfat verwendbar. *Porges* und *Spiro* empfehlen Natriumsulfat.

4fach verdünntes Plasma wird mit ¼ Volumen warmer gesättigter Natriumsulfatlösung versetzt. Man läßt den Niederschlag sich absetzen. Wegen der Eigenschaften des Natriumsulfats muß die ganze Prozedur bei zirka 32° vorgenommen werden, und zwar sowohl die Sättigung der Natriumsulfatlösung, als auch die Fällung des Plasma. Man läßt die Plasmasalzmischung mehrere Stunden lang — unter Vermeidung jeder Verdunstung — bei dieser Temperatur im Brutschrank stehen, z. B. in zugekorkten Meßzylindern. Danach wird bei derselben Temperatur filtriert.

Die N-Bestimmung geschieht nach *Kjeldahl*. Natürlich sind die Verdünnungen in Rechnung zu ziehen. Man überzeuge sich stets von der N-Freiheit des Natriumsulfats. Es enthält oft Spuren von Ammonsalzen.

Das Verfahren von *Reye*, besonders in der ihm von *Spiro* und *Porges* gegebenen Form, dürfte zurzeit die beste und bequemste Methode zum Nachweis wie zur quantitativen Bestimmung des Fibrinogens sein. Ganz zuverlässige Werte gibt sie aber wohl schon deshalb nicht, weil der Niederschlag wahrscheinlich stets geringe Anteile der anderen Globulinfraktionen enthält.

5. Methode von *Wohlgemuth*.[1]) 3 cm^3 frisch der Ader entquellenden Blutes werden mit 1 cm^3 20%iger Magnesiumsulfatlösung gemischt, die Mischung zentrifugiert und das Salzplasma abgehoben.

Eine Reihe von Reagenzgläsern wird nun mit absteigenden Mengen des Salzplasma beschickt, die Volumdifferenzen mit 1%iger kalkfreier Kochsalzlösung ausgeglichen und nun in jedem Gläschen je 1 cm^3 der 10fach verdünnten Fibrinfermentlösung hinzugefügt (Serum). Dann kommen alle Gläschen nach Umschütteln 24 Stunden in den Eisschrank. Danach kontrolliert man, ob Gerinnung eingetreten ist. Die ersten beiden Gläschen, die viel Plasma und daher auch viel Magnesiumsulfat enthalten, sind in der Regel flüssig geblieben. Die folgenden zeigen komplette, die mit sehr stark verdünntem Plasma partielle oder überhaupt keine Gerinnung. So zeigen z. B. in einer Serie die Röhrchen mit 1·0 und 0·5 cm^3 Plasma keine Gerinnung, zwischen 0·25 und 0·016 cm^3 Plasma ist überall ein mehr oder weniger ausgedehntes Gerinnsel zu sehen, die Proben mit 0·008 und 0·004 cm^3 Plasma sind flüssig geblieben.

Als Fibrinogeneinheit setzt *Wohlgemuth* diejenige Menge Plasma, die noch gerade ausreicht, um in Gegenwart eines Überschusses an Thrombin ein deutlich erkennbares Gerinnsel zu bilden. Man erhält also keine absoluten, sondern nur Vergleichswerte.

Vielleicht wären gerade bei dieser Methode Störungen durch Fibrinolyse noch genauer zu berücksichtigen. Geringe resp. mäßige Fibrinolyse kann auch bei niedriger Temperatur erfolgen.

IV. Gerinnungsbefördernde Substanzen.

Gerinnungsauslösende und -befördernde Substanzen kann man zweckmäßig in solche einteilen, die fertiges Thrombin enthalten — die Reindarstellung dieses Körpers ist bisher nicht geglückt — und in solche, in denen sich zwar kein fertiges Thrombin, wohl aber Thrombinvorstufen (Thrombogen und Thrombokinase) finden. Auch Kalksalze, z. B. Kalziumchlorid, können als gerinnungsbefördernde Substanzen gelten, endlich auch noch eine dritte Gruppe von Körpern, die zwar zur Fermentbildung nicht

[1]) *Wohlgemuth*, Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Fibrinferments etc. Biochem. Zeitschr. Bd. 27. S. 79 (1910).

erforderlich sind, wohl aber in noch unbekannter, unspezifischer Weise die Entstehung, vielleicht auch die Wirkung des Fibrinferments begünstigen. Das wären die zymoplastischen Substanzen *Schmidts*, die thromboplastischen Substanzen *Nolfs*. Aber die Anschauungen über die Wirkung solcher Körper sind noch wenig geklärt.

Durch genügenden Thrombinzusatz kann man jede überhaupt gerinnungsfähige Flüssigkeit zur Koagulation bringen. Die inaktiven Vorstufen des Thrombins sind aber natürlich nur dort wirksam, wo die sonstigen Vorbedingungen der Fermentbildung gegeben sind. Flüssigkeiten, die nur Kalksalze sowie Thrombokinase enthalten, werden zwar imstande sein, Vogelplasma oder Peptonblut zur Gerinnung zu bringen, in den proplastischen Flüssigkeiten *A. Schmidts*, in Fibrinogenlösungen, sind sie aber ohne Wirkung.

A. Thrombinlösungen.

1. Die am einfachsten zu gewinnende Thrombinlösung ist Blutserum. Sein Thrombingehalt ist recht schwankend, im ganzen gering, d. h. also, daß selbst ziemlich große Serummengen nur langsam Fibrinogenlösungen und andere fibrinogenhaltige Flüssigkeiten zur Gerinnung zu bringen vermögen. Blutserum, das längere Zeit, etwa mehrere Tage gestanden hat, ist weniger wirksam als ganz frisches. Die Fermentarmut des Blutserums erklärt sich durch 2 Momente: Erstens wird ein Teil des bei der Gerinnung gebildeten Thrombins auf dem Fibrinnetz adsorbiert und mit diesem entfernt und zweitens geht ein erheblicher Teil des einmal entwickelten Thrombins bald nach vollendeter Gerinnung in eine unwirksame Modifikation, das Metathrombin über, aus der es, wie schon *A. Schmidt* fand, wieder in Freiheit gesetzt werden kann. Auffallend arm an Thrombin ist das Blutserum des Pferdes.

Nachweis von Metathrombin im Serum. Das Verfahren — es ist bereits von *A. Schmidt* verwendet worden — gestattet es, in einfacher Weise aus fermentarmem Serum stark wirksame Lösungen herzustellen. Das kann unter Umständen zweckmäßig sein, besonders dann, wenn man die Dauer von Gerinnungsversuchen abkürzen oder sich schnell überzeugen will, ob eine Flüssigkeit fibrinogenhaltig ist. Pferdeserum wird mit dem gleichen Volumen $\frac{n}{10}$ Na OH versetzt und nach $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde mit $\frac{n}{10}$ H_2SO_4 neutralisiert. Die fermentative Kraft des Serums hat dann sehr stark zugenommen, gemessen an der Gerinnungszeit einer Fibrinogenlösung. Folgender, von mir früher ausgeführter Versuch mag das illustrieren:

Pferdeserum frisch	Fibrinogen	Temperatur	Aktiviert	Geronnen nach
5 Tropfen	5 cm^3	35°	nicht	$3^1/_2$ Stunden
5 „	5 „	35°	ja	8 Minuten

Die Wirkungen, die man durch Zusatz des gleichen Volumens $\frac{n}{10}$ Na OH erhält, sind übrigens noch nicht maximal. Noch größere Fermentmengen kann man in Freiheit setzen, wenn man auf je 10 *cm*³ Serum ½ Stunde lang 2—4 *cm*³ Normalnatronlauge einwirken läßt. Zu lange Wirkung der Na OH kann aber das Ferment wieder zerstören. Ebenso verliert das mit Alkali aktivierte Serum bei längerem Stehen ziemlich rasch wieder seinen Fermentreichtum. Auch Zusatz nicht aktivierten, thrombinhaltigen Serums setzt den Fermentgehalt herab.

Noch besser und mit noch kleineren Alkalizusätzen gelingt die Aktivierung des Metathrombins in dialysiertem Pferdeserum (*A. Schmidt*[1]). Hier genügt schon Zusatz von 0·1—0·2 *cm*³ $^1/_{10}$-Normalnatronlauge pro Kubikzentimeter Serum. Stärkere Alkalikonzentrationen zerstören das Thrombin leicht.

Auch durch Säurezusatz — etwa in entsprechender Menge — und nachfolgende Neutralisation wird die fermentative Kraft wesentlich verstärkt, aber doch nicht in dem Maße wie durch Alkali.

Rinder-, Hunde-, Katzenserum zeigen dieselbe Erscheinung. Doch sind die in Freiheit gesetzten Fermentmengen geringer.

Daß das Metathrombin Kinase sei, wie *Mellanby*[2]) meint, ist ganz unwahrscheinlich.

2. Thrombin nach *A. Schmidt.* Die Methode geht darauf aus, eine möglichst eiweißarme, dabei doch wirksame Thrombinlösung zu gewinnen. Man läßt eine bestimmte, nicht zu kleine Blutmenge spontan gerinnen. Sobald Serum abgepreßt ist, wird dieses mit dem 20fachen Volumen Alkohol (95%) gefällt. Der Alkohol bleibt einige Tage bis mehrere Monate über dem Niederschlage stehen. Die Dauer der Alkoholwirkung scheint nur von geringer Bedeutung für die Wirksamkeit der später zu gewinnenden Thrombinlösung zu sein. Will man diese aus dem Niederschlage herstellen, so wird der Alkohol abfiltriert, das Präzipitat getrocknet und mit Wasser extrahiert.

Wirklich eiweißarme Thrombinlösungen erhält man nur bei kurzdauernder Wasserextraktion. Sonst geht auch ziemlich viel Eiweiß in Lösung. Das scheint übrigens der Thrombinwirkung nicht hinderlich zu sein.

Die Thrombinlösung ist natürlich reich an Salzen. Der Salzgehalt läßt sich durch Dialyse gegen 0·9%ige Salzlösung vermindern. Metathrombin fehlt in diesen Thrombinlösungen. Wahrscheinlich bewirkt Alkohol schon eine Überführung in Thrombin.

Nach *Rettger*[3]) werden möglichst eiweißfreie Thrombinlösungen durch kurzes Aufkochen nicht vollständig inaktiviert, wohl aber eiweißreiche. Diese Tatsache soll gegen die Fermentnatur des Thrombins sprechen.

[1]) *A. Schmidt*, Zur Blutlehre. Leipzig 1892. S. 209.
[2]) *Mellanby*, The coagulation of blood. Journ. of Physiol. Vol. 38. p. 28 (1908/09).
[3]) *Rettger*, The coagulation of blood. Americ. Journ. of Physiol. Vol. 24. Nr. 4. p. 406 (1909).

Fängt man Blut direkt, ohne es vorher gerinnen zu lassen, unter Alkohol auf, so läßt sich aus dem Niederschlage später kein Thrombin extrahieren, ein Zeichen dafür, daß das Thrombin nicht schon im zirkulierenden Blute vorgebildet war. Alkohol scheint die Thrombinvorstufen zu zerstören.

3. Thrombin nach *Howell*.[1]) Eine größere, durch Schlagen von Schweinsblut gewonnene Fibrinmenge wird in fließendem Wasser bis zu völliger Hämoglobinfreiheit gewaschen. Das erfordert mehrere Stunden und muß von Zeit zu Zeit durch Kneten mit der Hand unterstützt werden. Die weiße Fibrinmasse wird dann möglichst fein verteilt und für 2—3 Tage im Eiskasten mit 8%iger Kochsalzlösung extrahiert, dann filtriert, zuerst durch Gaze, später durch Filtrierpapier. Das etwas trübe, stark thrombinhaltige Filtrat wird zur Entfernung der Eiweißkörper mehrfach tüchtig mit dem halben Volumen Chloroform durchgeschüttelt und filtriert, wobei der Chloroformniederschlag auf dem Filter bleibt. Diese Prozedur, die man mit der Schüttelmaschine vornehmen kann, ist so lange fortzusetzen, als das Filtrat noch trübe ist oder beim Kochen noch eine deutliche Fällung gibt. Endlich gewinnt man eine wasserklare, nahezu eiweißfreie Lösung, die immer noch ziemlich viel Thrombin enthält. (Geprüft an einer Fibrinogenlösung.) Die Methode ist umständlich, liefert aber nach *Howell* sehr wirksame Thrombinpräparate. Das zum Ausschütteln benutzte Chloroform kann durch Destillation wieder gewonnen werden.

Um dieses Thrombin in einen haltbaren Zustand überzuführen, läßt man geringe Mengen (5—10 cm^3) der Thrombinbildung bei 35—40° möglichst schnell in Uhrschälchen eintrocknen. In diesem Zustande hält es sich unbeschränkt, während es in wässeriger Lösung, auch bei Chloroformzusatz, ziemlich schnell an Wirkung einbüßt. Will man aus dem eingetrockneten Thrombin wieder eine Lösung herstellen, so verreibt man den im Uhrgläschen befindlichen, leicht gelben Belag mit etwas Wasser, dem man einige Kochsalzkristalle zusetzt.

Das Thrombin wird aus diesen Lösungen durch Halbsättigung mit Ammonsulfat niedergeschlagen.

B. Andere gerinnungsbefördernde Substanzen.

1. Thrombogen (*Morawitz, Nolf*, l. c.) findet sich im Blutplasma und Blutserum, vielleicht auch noch in den Blutplättchen. Es ist gegen Erwärmen empfindlich und wird bei einer Temperatur von 56—60° inaktiviert. Auch unter gewissen natürlichen und experimentellen Bedingungen scheint es zerstört zu werden. Es fehlt z. B. in den proplastischen Flüssigkeiten, die auf Zusatz von Thrombokinase und Kalksalzen nicht gerinnen, ebenso in den nach *Hammarsten* bereiteten Fibrinogenlösungen, falls sie stärker verdünnt sind. Endlich kann man auf experimentellem Wege durch

[1]) *Howell*, The preparation and properties of Thrombin etc. Amer. Journ. of Physiol. Vol. 26. Nr. 7. S. A. (1910).

subakute Phosphorintoxikation das Thrombogen (und Fibrinogen) bei Hunden zum Verschwinden bringen. Ausgewachsene Hunde erhalten nach *L. Loeb*[1]) innerhalb 8—10 Tagen 7—8mal 0·07 *g* Phosphor per os oder etwas kleinere Dosen subkutan in Form von 1%igem Phosphoröl. Doch reagieren einzelne Hunde gegen die Intoxikation recht verschieden: daher gelingt der Versuch nicht in jedem Falle. Kaninchen scheinen nach eigenen Beobachtungen ungeeignet zu sein. Beim Hunde verliert aber das Blut gegen Ende des Lebens meist sukzessive mehr und mehr seine Gerinnbarkeit. Schließlich bleibt es ganz flüssig. Es enthält dann kein Fibrinogen mehr, aber auch kein Thrombogen. Das läßt sich durch geeignete Kombinationsversuche zeigen.

Auch im Blutserum findet sich nach vollendeter Gerinnung noch Thrombogen. Durch Zusatz von Thrombokinase lassen sich im Blutserum neue, oft sehr große Fermentmengen in Freiheit setzen, die man durch Zufügen einer Fibrinogenlösung nachweisen kann.

Thrombogen wird nur im Blute bzw. in der Lymphe gefunden. Die Gewebe enthalten, falls man für Entfernung aller Blutspuren sorgt, kein Thrombogen.

2. Gerinnungsbefördernde Substanzen der Zellen (Zymoplastische Substanzen, Thrombokinase). Zymoplastische Substanzen nach *A. Schmidt.*[2]) Zellen verschiedener Organe werden auf dem Wasserbade mit Rückflußkühler mit siedendem Alkohol mehrfach extrahiert, die alkoholischen Auszüge vereinigt und eingedampft. Man erhält einen gelblichen, vornehmlich aus Lipoiden bestehenden Rückstand, der in Wasser aufgeschwemmt und fein verteilt die Gerinnung des verdünnten Magnesiumsulfat-, Gallensalzplasma und mancher Transsudate stark beschleunigt. *A. Schmidt* nahm an, die zymoplastischen Substanzen spalteten Thrombin aus seinem Proferment (Thrombogen) ab. *Nolf* denkt an thromboplastische Wirkungen unspezifischer Natur. Die Substanzen sollen nur den Reaktionsablauf verkürzen.

Die Wirkung der zymoplastischen Substanzen müßte wohl noch genauer untersucht werden. Ich habe bei Versuchen mit Blutserum, zymoplastischen Substanzen und Fibrinogenlösungen deutliche Resultate überhaupt nicht gesehen.

Thrombokinase (Thrombozym von *Nolf*). Diese soll bei Gegenwart von Kalksalzen mit dem Thrombogen des Plasma wirksames Thrombin bilden resp. die Gerinnung veranlassen. Nach *Morawitz* ist die Thrombokinase ein allgemeines Protoplasmaprodukt, nach *Nolf* findet sie sich indessen nur in den Zellen des Blutes und der Gefäße. In Organextrakten hat man nach *Nolf* zwar stets Thrombokinase, daneben aber noch unspezifische, thromboplastisch wirkende Substanzen. In isolierten Zellen, z. B.

[1]) *L. Loeb*, Weitere Untersuchungen über Blutgerinnung. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 5. S. 534 (1904).

[2]) *A. Schmidt*, Zur Blutlehre. Leipzig 1892.

Spermatozoen, soll Thrombokinase fehlen, ebenso bei niederen Tieren, Bakterien etc. Diese Fragen müßten wohl noch genauer als bisher untersucht werden. Man gewinnt die Thrombokinase durch Extraktion sorgfältig entbluteter und gereinigter Organe mit Kochsalzlösung. Gewöhnlich habe ich gleiche Mengen Organbrei und Kochsalzlösung genommen, ca. $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde mit der Maschine geschüttelt (manuelles Schütteln genügt auch), dann die Mischung mehrere Stunden lang in den Eisschrank gestellt. Danach wird dekantiert und die trübe aussehende Kochsalzlösung zu Gerinnungsversuchen verwendet.

Es hat nach meiner Erfahrung keinen Wert, danach zu streben, möglichst klare Lösungen herzustellen. Je klarer eine Lösung ist, um so geringer ist die Intensität ihrer Wirkung. Preßsäfte von Geweben, die mit der Buchnerpresse hergestellt waren, zeigten sich weniger wirksam, als die mit der oben beschriebenen Methode gewonnenen Extrakte.

Besonders wirksame Gewebsextrakte erhält man aus Thymus, Lymphknoten, Leber. Die gerinnungsbefördernde Wirkung ist bis zu einem gewissen Grade spezifisch für die einzelnen Tierarten (*L. Loeb*[1]), *Muraschew*[2]).

Wenige Tropfen Thrombokinase kürzen die Gerinnung des Blutes in toto ungemein ab. Sie bringen ferner Gansplasma, Peptonplasma und abgekühltes Pferdeplasma schnell zur Gerinnung, während sie in den echten proplastischen Flüssigkeiten *Schmidts* unwirksam bleiben, ebenso in Fibrinogenlösungen. Die Kinase bedarf zu ihrer Wirkung der Ca-Ionen. Daher vermag sie im Oxalat- und Fluoridplasma keine Wirkung zu entfalten.

Da die Thrombokinase sehr labil ist, gelingt es nur schwer und unvollkommen, sie zu konservieren. Gewebsextrakte werden trotz Zusatz von Toluol oder Chloroform in wenigen Tagen fermentativ unwirksam, ja es treten während der Autolyse sogar gerinnungshemmende, hitzebeständige Körper auf (*Conradi*[3]). Alkohol- und Azetonfällung vernichtet ebenfalls die gerinnungsbeschleunigende Wirkung, ebenso höhere Temperaturen (ca. 70 bis 80°). Durch Eintrocknen bei niederer Temperatur (ca. 35—40°) im Vakuum gelingt es hingegen, ein trockenes Gewebepulver herzustellen, das wenigstens in gewissem Maße sich die gerinnungsbefördernden Eigenschaften bewahren kann.

Die Thrombokinase beschleunigt nicht allein die Gerinnung des Blutes in vitro, sondern vermag auch bei intravenöser Injektion durch intravaskuläre Gerinnungen (vornehmlich im Pfortadergebiet und rechten Herzen) tödlich zu wirken, während Injektionen von Fibrinferment selbst nur

[1]) *L. Loeb*, Versuche über einige Bedingungen der Blutgerinnung etc. *Virchows* Arch. Bd. **176**. S. A. (1904).

[2]) *Muraschew*, Über die Spezifizität des Fibrinferments und seiner Vorstufen. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. **80**. S. 187 (1904).

[3]) *Conradi*, Über die Beziehungen der Autolyse zur Blutgerinnung. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. **2**. S. 136 (1901/02).

selten deletär verlaufen (*Wooldridge*[1]), *Boggs*[2]), *Conradi*[3]), *A. Köhler*[4]), *Edelberg*[5]).

Bei niederen Tieren, speziell Krustazeen, scheinen die Gewebssäfte einen Körper zu enthalten, der nicht wie eine Kinase, sondern wie Thrombin wirkt. Er bedarf aber zu seiner Wirkung der Kalksalze (*L. Loeb*[6]), *Nolf*[7]).

C. Quantitative Bestimmung des Thrombingehaltes.

Der Versuch einer quantitativen Bestimmung des Thrombingehaltes kann folgendes bezwecken: 1. Messung des Thrombingehaltes in einer Lösung, z. B. im Serum und 2. Bestimmung der bei der Gerinnung überhaupt gebildeten Thrombinmenge. Diese beiden Dinge sind nicht identisch; denn ein erheblicher Teil des Thrombins wird ja nach vollendeter Gerinnung schnell unwirksam. Der Thrombingehalt des Serums kann also nie einen brauchbaren Indikator weder für die Gerinnungszeit, noch für die während der Gerinnung gebildeten Thrombinmengen abgeben.

Man mißt den Thrombingehalt in der Art, daß man die Zeit bestimmt, die eine fibrinogenhaltige Flüssigkeit bis zur vollendeten Gerinnung braucht. Starke Thrombinmengen wirken natürlich schneller als geringe. Ob aber eine direkte Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Fermentmenge in Form einer einfachen Proportion vorliegt, ist noch unsicher. Über das Zeitgesetz des Fibrinferments herrscht nämlich noch keine völlige Übereinstimmung (vgl. *Fuld*[8]), *Martin*[9]), *L. Loeb*[10]).

1. Quantitative Bestimmung des Thrombins im Serum (nach *Wohlgemuth*[11]).

Eine Reihe von Reagenzgläsern wird mit absteigenden Mengen Serum beschickt, die Volumdifferenzen mit den entsprechenden Quantitäten 1%iger kalkfreier Kochsalzlösung ausgeglichen und nun zu jeder Portion 2 *cm*³

[1]) *Wooldridge*, Über intravaskuläre Gerinnungen. Arch. f. Anat. u. Physiol. Physiol. Abt. S. 397 (1886).

[2]) *Boggs*, Über Beeinflussung der Gerinnungszeit des Blutes etc. Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 79. S. 539 (1904).

[3]) *Conradi*, l. c.

[4]) *A. Köhler*, Über Thrombose und Transfusion. I.-D. Dorpat 1877.

[5]) *Edelberg*, Über die Wirkungen des Fibrinfermentes im Organismus. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. Bd. 11. S. 283 (1880).

[6]) *L. Loeb*, Über die Koagulation des Blutes einiger Arthropoden. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 5. S. 191 (1904) und Bd. 6. S. 260 (1905).

[7]) *Nolf*, La coagulation chez les crustacés. Arch. internat. de Physiol. Vol. 8. H. 4 S. A. (1909).

[8]) *Fuld*, Über das Zeitgesetz des Fibrinferments. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 2. S. 514 (1902).

[9]) *Martin*, Observations upon Fibrin-ferment in the venoms of snakes etc. Journ. of Physiol. Vol. 33. p. 207 (1905).

[10]) *L. Loeb*, Einige neuere Arbeiten über die Blutgerinnung bei Wirbellosen und Wirbeltieren. Biochem. Zentralbl. Bd. 6. S.-A. (1907).

[11]) *Wohlgemuth*, Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Fibrinfermentes etc. Biochem. Zeitschr. Bd. 27. S. 79 (1910).

eines nach *A. Schmidt* bereiteten Magnesiumsulfatplasma gesetzt. Die Gläschen kommen auf 24 Stunden in den Eisschrank. Danach überzeugt man sich, in welchen Gläschen totale, in welchen partielle Gerinnung eingetreten ist und welche endlich ganz flüssig geblieben sind. Man bestimmt so den Grenzwert der koagulierenden Kraft einer Thrombinlösung.

Man könnte natürlich auch, wie das früher ganz allgemein geschehen ist, mit größeren Thrombinmengen arbeiten und die Zeit bis zur vollendeten Gerinnung bestimmen. Auch auf diese Weise muß man, falls man stets gleiche Mengen Serum und Fibrinogenlösung nimmt, brauchbare Vergleichswerte erhalten. Es wäre zu untersuchen, ob die Resultste beider Methoden sich ungefähr entsprechen.

2. Bestimmung der Kurve der Thrombinbildung in gerinnendem Blute (nach *Arthus*[1]).

Während oder kurz vor Beginn der Gerinnung wird der Vorgang der Fermentbildung plötzlich durch Zusatz von Fluornatrium unterbrochen. Das Fluornatrium wirkt kalkfällend, verhindert also die Entstehung neuer Fermentmengen, nicht aber die Wirkung des schon gebildeten Thrombins. Man setzt soviel Fluornatrium hinzu, daß dessen Konzentration im Blute etwa 2—3‰ beträgt. Ein bestimmter, stets gleicher Teil des entkalkten Blutes wird sofort in kalkfreie Fibrinogenlösung übertragen und die Gerinnungszeit dieser Lösung bestimmt. Falls man das Verfahren mit möglichst zahlreichen, gleichzeitig oder nahezu gleichzeitig gewonnenen Blutproben und während der verschiedensten Stadien des Gerinnungsvorganges wiederholt, kann man eine Kurve der Fermententstehung während der Gerinnung konstruieren. Nach *Arthus* steigt die Fermentproduktion nach Entleerung des Blutes aus den Gefäßen zunächst langsam, kurz vor der Gerinnung aber sehr steil an. Auch der Abfall nach vollendeter Koagulation erfolgt rasch.

3. Quantitative Schätzung des gesamten, bei der Gerinnung gebildeten Thrombins.

Man fängt Blut in einer Lösung auf, die ein Antifibrinferment enthält, am besten Hirudin. Das Hirudin hat wahrscheinlich quantitative Beziehungen zum Thrombin, es neutralisiert eine bestimmte Menge des Fermentes. Je mehr Thrombin sich bildet, um so größere Mengen Hirudin werden auch erforderlich sein, die Gerinnung zu hemmen. Ich habe gewöhnlich 5 cm^3 Blut in 5 Tropfen (0·25 cm^3) 1‰iger Hirudinlösung aufgefangen. Hierdurch wird die Gerinnung normalen Blutes deutlich, wenn auch nicht sehr stark verzögert. Bei Hämophilie und anderen hämorrhagischen Diathesen zeigt eine sehr starke Verzögerung, eventuell sogar Aufhebung der Koagulation an, daß man es nicht mit einer verlangsamten, wahrscheinlich auch quantitativ ungenügenden Fermentbildung zu tun hat.

[1]) *Arthus*, Étude sur la production du Fibrinferment dans le sang extrait des vaisseaux. C. r. Soc. Biol. T. 53. p. 1024 (1901).

Die vollständige Analyse eines 24stündigen Urins.

Von **Otto Folin**, Boston.

Die vollständige Analyse des Urins in Verbindung mit umfassender Stoffwechseluntersuchung ist etwas verschieden von demjenigen Analysengang, bei dem nur der eine oder der andere Bestandteil allein berücksichtigt wird. Der Experimentator muß mit den anzuwendenden Methoden natürlich so vertraut sein, daß weder Zeit noch Urin durch überflüssige Wiederholungen der Bestimmungen verloren gehen. Wenn der Forscher die nötige Vertrautheit und Fertigkeit in der Ausführung der betreffenden Methoden besitzt, kann er das sonst übliche Vorgehen, alle Analysen doppelt auszuführen, vorteilhaft unterlassen, so daß die Hälfte des Urins und beträchtlich an Zeit gespart werden. Bei Betrachtung der erhaltenen analytischen Resultate ist es gewöhnlich möglich, festzustellen, ob irgend ein wesentlich anderes Resultat gezeitigt wurde als dasjenige, welches unter den Bedingungen des betreffenden Versuches zu erwarten war. „Überraschende" Ergebnisse müssen dann natürlich durch Wiederholung der Analyse nachgeprüft werden. Eine solche nachherige Wiederholung bildet eine wertvollere Kontrolle der Richtigkeit der Analyse, als wenn von Anfang an mechanisch zwei Bestimmungen nebeneinander ausgeführt werden.

Aufsammeln des 24stündigen Urins.

Das Sammeln des täglichen Urins sollte an irgend einem bestimmten frühen Morgen beginnen, so daß sich der Nachturin immer mit dem Harn des vorhergehenden Tages findet. Der Grund dafür ist der Umstand, daß der nächtliche Urin durch die am vorhergehenden Tage genossene Nahrung wesentlich beeinflußt ist. Für das zuverlässige Sammeln des Harns sind Verständnis und Sorgfalt erforderlich. Bei der Defäkation der Versuchsperson muß zu gleicher Zeit der Urin getrennt in einem Becher oder einem passenden Gefäß aufgefangen werden. Bei einem weiblichen Individuum muß das Sammelgefäß in zwei Abteilungen geteilt sein, um eine vollständige Trennung des Urins von den Fäzes sicher bewerkstelligen zu können.

Aufbewahrung des Urins.

Wenn der Urin richtig konserviert wird, kann er in den meisten Fällen fast unbegrenzte Zeit lang aufbewahrt werden. Die einzige Veränderung, die stattfindet, ist die Umbildung eines Teiles des Kreatinins in Kreatin. Gewisse Urine, solche von Fieberkranken, oder Urine, welche nicht deutlich sauer sind, können nicht aufbewahrt werden wegen der Bildung von Urat- und Phosphatniederschlägen, deren Gegenwart die Analysenresultate beeinträchtigt. Um eine wirksame Konservierung des Urins zu bewerkstelligen, fügt man vorteilhaft 5—10 *cm*³ einer 10⁰/₀igen Chloroformlösung von Thymol zu einer 24stündigen Urinmenge. Diese Lösung sollte in die Zweiliterflasche, in der der Harn aufgefangen werden soll, vor dem Aufsammeln gefügt werden. Es ist sehr wünschenswert, daß man jede Urinmenge, welche entleert wird, unmittelbar in jener Flasche aufsammelt. Beiläufig möge erwähnt sein, daß verunreinigter Harn bereits einige Stunden bevor irgend eine bemerkenswerte Vermehrung seines Ammoniakgehaltes wahrzunehmen ist, den charakteristischen Fäulnisgeruch aufweist. Durch rasches Vorgehen, d. h. durch sofortige Ausführung der Säurebestimmung, der Ammoniak-, Harnsäure und Kreatininbestimmung, in genannter Reihenfolge, können solche Urine gelegentlich für die Analyse gerettet werden. In derartigen Fällen sollte man eine zweite Ammoniakbestimmung nach Verlauf von 3—6 Stunden ausführen. Wenn das nun erhaltene Resultat mit demjenigen der ersten Bestimmung übereinstimmt, ist die Zersetzung des Urins noch nicht so erheblich, daß die anderen analytischen Ergebnisse beeinträchtigt sind.

Bei der Analyse des Urins kann Zeit und Mühe gespart werden, wenn man die Bestimmung zu richtiger Zeit und in zweckmäßiger Reihenfolge vornimmt. Beispielsweise sollte die Säure- und Ammoniakbestimmung zuerst ausgeführt werden, und zwar nebeneinander, indem man dieselbe 20 oder 25 *cm*³-Pipette zum Abmessen des Urins benutzt. Gleichfalls sollten die Gesamtstickstoff- und Harnstoffbestimmungen zusammen begonnen werden, indem man auch hierbei zum Abmessen des Urins dieselbe 5 *cm*³-Pipette verwendet. Die Harnsäurebestimmung sollte immer am ersten Tag angefangen werden, denn bei vielen Urinen beginnt die Harnsäure bereits am Ende des ersten Tages oder am zweiten Tage auszufallen und, wenn dies geschieht, ist es praktisch unmöglich, zuverlässige Zahlen für die Harnsäure zu erhalten.

Im Folgenden findet sich eine Beschreibung der Methoden zur vollständigen Analyse des Harns. Sind die betreffenden Methoden schon in früheren Bänden dieses Handbuches beschrieben, dann ist auf die entsprechenden Seiten verwiesen.

Urinvolumen.

Für alle Bestimmungen genügen 750—800 *cm*³ Urin.

Zum Messen der täglichen Urinmenge sind gewöhnliche Meßzylinder genau genug. Zu Untersuchungen, die mehrere 24stündige Urinmengen

beanspruchen, ist es empfehlenswert, vor Beginn der Analyse, in Hinsicht auf die Berechnungen, den Harn auf ein bestimmtes, für den betreffenden Fall geeignetes Maß zu verdünnen. Es ist dann wünschenswert, das spezifische Gewicht vor und nach der Verdünnung zu nehmen.

Spezifisches Gewicht.

Für die spezifische Gewichtsbestimmung des Urins hat man gewöhnlich kurze Spezial-Areometer gebraucht, die das spezifische Gewicht von 1·000—1·060 anzeigen. Solche Instrumente werden häufig zu niederen Preisen an Ärzte verkauft. Sie sind, wie ich gefunden habe, nur für 1·000, das spezifische Gewicht des Wassers, genau und sind äußerst unzuverlässig bei den Graden, bei denen in unserem Falle die Genauigkeit am häufigsten gebraucht wird, zwischen 1·015 und 1·035. Es sollte ein hoch graduierter Areometer, der zwischen 1·000 und 1·060 anzeigt und mindestens 30 *cm* lang ist, benutzt werden. Mit einem solchen Areometer kann das spezifische Gewicht des Urins in dem Meßzylinder genommen werden, in dem das Volumen abgemessen wird.

Die Gesamtazidität des Urins.

In den letzten Jahren sind mannigfaltige Erörterungen und viel experimentelles Material über die Natur der Azidität des Harns und die Prinzipien, die diesen Bestimmungen zugrunde liegen, mitgeteilt worden.[1]) Indessen ist bis jetzt noch kein Indikator für die Titration jener Azidität vorgeschlagen worden, der so geeignet ist, wie Phenolphtalein, für die Bestimmung der Gesamtmenge der freien Säure im Urin.

Die Titration der Gesamtazidität des Urins wird wie folgt ausgeführt *(Folin)*.[2])

Zu 25 *cm*³ Urin, in einem Erlenmeyerkolben befindlich, fügt man 20 *g* pulverisiertes, genau neutralisiertes Kaliumoxalat und 2 oder 3 Tropfen einer 1%igen alkoholischen Phenolphtaleinlösung, schüttelt 2 Minuten lang um und titriert, indem man noch weiter schüttelt, mit Zehntelnormal-Natronlauge, bis eine schwache aber unverkennbare Rosafärbung auftritt. Dann wird das Resultat auf die ganze 24stündige Urinmenge mit Rücksicht auf Zehntelnormal-Säure umgerechnet.

Die zugefügte, beträchtliche Menge Oxalat dient einem doppelten Zweck. Es wird dadurch die störende Wirkung des Calciums beseitigt, und

[1]) *R. Höber*, Die Acidität des Harns vom Standpunkte der Ionenlehre. *Hofmeisters* Beiträge, Bd. 3, S. 525. 1903. — *H. Dreser*, Über Harnacidität. *Hofmeisters* Beiträge, Bd. 6, S. 177. 1905. — *L. Henderson*, Gleichgewicht zwischen Basen und Säuren im tierischen Organismus. Ergebnisse der Physiologie, Bd. 8, S. 254. 1909. — Derselbe, Zur Kenntnis des Ionengleichgewichts im Organismus. III. Messungen der normalen Harnacidität. Biochemische Zeitschrift, Bd. 24, S. 40. 1910.

[2]) *O. Folin*, The acidity of urine. American Journal of Physiology, Vol. 9, p. 265. 1903.

ferner wird der schädliche Einfluß der Ammoniaksalze auf ein Minimum vermindert. Der letztere Effekt wird zum Teil durch Erniedrigung der Temperatur der Lösung hervorgerufen. Durch den Zusatz scheint die Hydrolyse der Ammonsalze fast gänzlich verhindert zu sein. Es ist wenigstens eine Tatsache, daß eine Ammoniumsalzlösung, welche mit Kaliumoxalat in beschriebener Weise gesättigt ist, sich Phenolphtalein gegenüber fast neutral verhält, mehr als eine ähnliche Lösung, welche nur abgekühlt ist.

Außer der Gesamtazidität des Urins ist es manchmal wünschenswert, die Mineralazidität zu bestimmen oder das Verhältnis zwischen anorganischen Säuren und anorganischen Basen, welche sich im Urin finden. Diese Bilanz könnte natürlich einerseits durch Bestimmung des gesamten Chlors, Phosphors und Schwefels und andrerseits durch Feststellung des gesamten Natriums, Kaliums, Calciums und Magnesiums ermittelt werden. Einfacher wird sie direkt nach folgender Methode bestimmt *(Folin)*.[1]

In einer Platinschale wird nicht weniger als 0·3 *g* und nicht mehr als 0·6 *g* reines, trockenes, gekörntes Kaliumkarbonat genau abgewogen. Nachdem man 25 *cm*³ Urin zugefügt hat, wird die so erhaltene alkalische Lösung auf einem Sandbad oder einem elektrischen Ofen zur Trockene verdampft. Wenn der Inhalt der Schale völlig trocken ist, wird unter Rotglut über einem Radialbrenner, welcher breit genug ist, um die ganze Grundfläche der Schale zugleich zu erhitzen, geglüht. Das Erhitzen sollte ungefähr noch eine halbe Stunde unterhalten werden, nachdem bereits alle sichtbaren Ammoniakdämpfe ausgetrieben worden sind. Am Ende dieses Zeitpunktes ist immer noch Ammoniak im Rückstand vorhanden. Der Rückstand wird jetzt erkalten gelassen und nun durch Zusatz von ungefähr 10 *cm*³ Wasser gänzlich durchfeuchtet. Früher benutzte man Wasserstoffsuperoxyd; jedoch erfüllt Wasser denselben Zweck. Das Wasser löst die alkalische Schicht, welche die organische Substanz bedeckt, und bewirkt dadurch daß gewisse Stickstoffverbindungen, die bei trockener Hitze beständig sind, entbunden werden. Die resultierende Lösung wird jetzt wieder zur Trockene verdampft und dann wieder eine Stunde lang unter Rotglut mittelst des Radialbrenners erhitzt. Danach ist der Rückstand noch mehr oder weniger durch unverbrannte Kohle schwarz gefärbt, aber er ist jetzt frei von Ammoniakverbindungen. Die rückständige Masse wird nun sogleich gelöst und mit Wasser und 75—100 *cm*³ Zehntelnormal-Salzsäure in einen Erlenmeyerkolben gespült. Diese Säuremenge sollte genügend sein, um die Lösung sauer zu machen. Zu der sauren Lösung, die ein wenig Kohle suspendiert enthält, setzt man zwei Tropfen Phenolphtaleinlösung zu und kocht dann fünf Minuten lang, um die Kohlensäure zu vertreiben. Nach Abkühlung und Zusatz einer geringen Menge (ungefähr 1 *g*) neutralen Kaliumoxalates wird die Lösung mit Zehntelnormal-Natronlauge bis zu einer schwachen, aber unverkennbaren Rosafärbung titriert. Bis auf eine (gering-

[1] *O. Folin*, The acidity of urine. American Journal of Physiology, Vol. 9. p. 265. 1903.

fügige) Menge von suspendierter Kohle in der Lösung muß der Endpunkt der Titration klar und unverkennbar sein. Wenn erwünscht, kann die Kohle durch Filtration entfernt werden.

Ehe man die Resultate der Bestimmung in Zehntelnormal-Säure umrechnet, ist es natürlich erforderlich, den Wert des zu Beginn der Operation zugesetzten Kaliumkarbonates festzustellen. Dies wird so ausgeführt, daß man eine geringe bekannte Menge des Salzes mit einem Überschuß von Normalsäure erhitzt, dann abkühlt und titriert. Der Wert des Kaliumkarbonats plus dem des Natriumhydrates, das bei der Endtitration verbraucht wird, subtrahiert von dem Wert, welcher der zugefügten Normalsalzsäure entspricht, repräsentiert das zwischen anorganischen Säuren und anorganischen Basen (Metallen im Urin) bestehende Verhältnis. Die so bestimmte Mineralazidität stellt nicht den Überschuß an freier Mineralazidität dar, welche tatsächlich in dem Harn enthalten ist. Ein Teil dieser Azidität ist nämlich durch organische Verbindungen neutralisiert, wie sie in den organischen Sulfaten vorkommen. Ein anderer und beträchtlicherer Teil ist durch Ammoniak neutralisiert. Unter Berücksichtigung dieser für Ammoniak und für die organischen Sulfate in Betracht kommenden Werte wird die freie Mineralazidität des Urins bestimmt. Zur Berichtigung des Wertes für die organischen Sulfate macht *Folin* die empirische Annahme, daß sowohl die „ätherischen" Sulfate als auch der „neutrale Schwefel" als Schwefelsäure anwesend sind, in der eine Hälfte der Azidität durch organische Verbindungen neutralisiert ist. Da nun diese organischen Verbindungen während des Glühens zerstört werden, würde eine Hälfte der Azidität frei gemacht, die sich aus der Schwefelsäure des neutralen Schwefels und der ätherischen Sulfate, wie sie gewöhnlich bestimmt werden, berechnet.

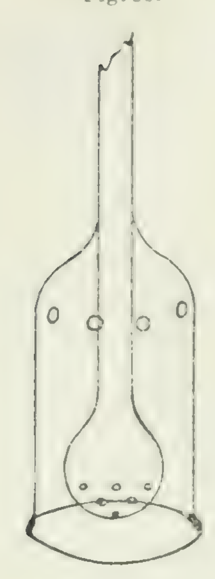
Ammoniak.

Im Zusammenhang mit systematischen, vollständigen Harnanalysen ist es wichtig, nur Methoden zu gebrauchen, welche ein Minimum an Zeit erfordern. Die *Folin*sche Luftstrommethode zur Bestimmung des Ammoniaks entspricht dieser Anforderung (vgl. Bd. III dieses Werkes, 2, S. 766) und ist außerdem im ganzen zuverlässiger als irgend eine andere Methode, wenn man einmal mit dem in dem betreffenden Laboratorium zur Verfügung stehenden Luftstrom genau vertraut geworden ist.

Über den Gebrauch dieser Methode sind die folgenden Mitteilungen beachtenswert. Es ist erforderlich, daß die Genauigkeit der Methode für einen bestimmten Apparat und Luftstrom gründlich ausgeprüft ist. Dies sollte so ausgeführt werden, daß man das Ammoniak in dem erhältlichen, reinsten Ammoniumsulfat bestimmt und die Resultate durch Destillation nach der gewöhnlichen Kjeldahl-Methode nachprüft. Andere Ammoniumsalze, wie zum Beispiel die Chloride, sollten für diesen Zweck nicht benutzt werden, denn sie enthalten fast immer Pyridinbasen, welche bei der Destillation mit über-

gehen würden und als Ammoniak zur Titration kämen. Je geringer das Volumen ist, welches man braucht, je schneller und leichter wird das Ammoniak durch den Luftstrom übergetrieben. Bei einem ziemlich schwachen Strom sind 20 cm^3 Urin 25 cm^3 vorzuziehen. Es ist kaum nötig, die Luft mit Schwefelsäure zu waschen, wie es *Klercker* empfiehlt (vgl. l. c. S. 766), da die gebrauchte Luft meistens Außenluft ist oder mit Wasser gewaschen wird, indem sie die Luftpumpe passiert.

Fig. 88.



Für das früher angegebene Absorptionsrohr (vgl. l. c. S. 766, Fig. 259) sollte man die im Folgenden angeführte, verbesserte Form benutzen.

Harnstoff.

Folins Methode (Bd. III dieses Werkes, 2, S. 778). Wenn diese Methode richtig ausgeführt wird, gibt sie sehr zuverlässige Resultate. Die beiden Hauptfaktoren, welche beachtet werden müssen, sind: erstens, daß das Erhitzen so lange fortgesetzt wird, bis aller Harnstoff zersetzt ist; zweitens, daß die Destillation so reguliert wird, daß sie eine volle Stunde durchgeführt werden kann, ohne daß der Inhalt des Destillationskolbens trocken wird. Die im Folgenden angegebene, bis jetzt noch nicht veröffentlichte Modifikation der ursprünglichen Methode erleichtert die Bestimmung.

Für die Zersetzung ist eine Temperatur von ungefähr 150° erforderlich. Bei dieser Operation bedient man sich vorteilhaft etwas Chlorjodquecksilbers, $HgClJ$. Diese Substanz ist deshalb außerordentlich empfehlenswert, da sie ein Indikator für die Temperatur in Verbindung mit der Zersetzung des Harnstoffes ist. Chlorjodquecksilber, $HgClJ$, ist ein hellrotes Pulver, welches bei 125° gelb wird und bei 153° schmilzt. Es wird dargestellt, indem man in einem geschlossenen Rohr molekulare Mengen reinen Chlorquecksilbers und Jodquecksilbers 6—8 Stunden lang auf ungefähr 160° erhitzt.[1]) Das pulverisierte Produkt wird dann in kleinen Glaskolben (Jena-Glas) von ungefähr 0·5 cm^3 Inhalt verschlossen aufbewahrt. Wenn richtig ausgeführt, kann man solche Gefäße unbegrenzt lange benutzen, um die Temperatur 153° anzeigen zu lassen.

In einem Kjeldahlkolben (von 500 cm^3 Inhalt) werden nun 5 cm^3 Urin eingemessen und 20 *g* Magnesiumchlorid, 2—5 cm^3 konzentrierte Salzsäure, ein kleines Stück Paraffin und einige Tropfen roter Alizarinlösung zugesetzt. Der Mischung wird schließlich in das oben beschriebene Glaskölbchen, das als Temperaturanzeiger dient, zugefügt. Der Kolben wird nun in aufrechter Stellung über eine passende Flamme gebracht. Das überschüssige Wasser wird abgedampft. Die Mischung wird nach und nach heißer, bis der

[1]) *Köhler*, Über Quecksilberchlorjodid. Ber. Chem. Ges., Bd. 12, S. 1187, 1879.

Indikator im Glasköllbchen zunächst gelb wird und schließlich schmilzt. Dieses Stadium sollte in ungefähr 15 Minuten erreicht werden, und zwar so, daß die Mischung dann noch sauer reagiert.

Von diesem Punkte an handelt es sich nur noch um die Art und Weise des Erhitzens, damit — während ein und einer halben Stunde lang — kein Wasser mehr entweicht und die noch vorhandene Salzsäure zurückbleibt. Ein gewöhnlicher Kühler wird natürlich am besten diesem Zwecke dienen. Wenn ein solcher Kühler benutzt wird, ist es vorteilhaft, das Erhitzen vorher einige Minuten länger fortzusetzen, damit das Wasser entweicht, welches im oberen Teil des Kjeldahlkolbens zurückgeblieben ist. Ehe man die Verbindung mit dem Kühler herstelllt, fügt man noch zwei oder drei Tropfen konzentrierter Salzsäure zu.

An Stelle eines gewöhnlichen Kühlers kann man sich eines Reagenzrohres von 20 *cm* Länge, das mit kaltem Wasser gefüllt ist, bedienen. Indem man dieses Reagenzglas am Halse des Kolbens mittelst eines Korkes befestigt, so daß eine Hälfte davon sich außerhalb des Halses des Kjeldahlkolbens befindet, kann man die Operation ohne Mühe beenden, vorausgesetzt, daß die Flamme so reguliert wird, daß die Mischung nicht zu stark siedet. Sollte das Produkt in dem Kolben rot werden, so müßte man tropfenweise Salzsäure hinzufügen, bis die Lösung wieder gelb ist.

Nach Verlauf von anderthalb Stunden wird das Erhitzen unterbrochen und der Kolben etwas abgekühlt. Hiernach werden 350—400 cm^3 Wasser (am besten heißes Wasser) und 15—20 cm^3 10%iger Natronlauge zugefügt. Nachdem darauf das Ammoniak überdestilliert worden ist, wird gekocht, dann abgekühlt und titriert. Die Destillation sollte mindestens eine Stunde unterhalten werden, da das Ammoniak selten in kürzerer Zeit völlig übergetrieben wird.

Die erhaltene Menge des Harnstoffstickstoffs sollte zunächst in Prozent des gesamten Stickstoffs ausgerechnet werden. Wenn die 24stündige Menge des Gesamtstickstoffs mehr als 12 *g* beträgt, sollte der Prozentgehalt des Harnstoffstickstoffs nicht weniger als 87% betragen. Wenn der Stickstoff viel mehr als 12 *g* ausmacht, sollte der Prozentgehalt desselben als Harnstoff noch höher sein. Andrerseits, wenn der Gesamtstickstoff sehr niedrig ist (4—7 *g*), kann der Prozentsatz des Harnstoffstickstoffs bis auf 60% oder weniger sinken. [1])

Gesamtstickstoff.

Vgl. Bd. III dieses Werkes, S. 230.

Kreatin und Kreatinin.

Vgl. Bd. III dieses Werkes, 2, S. 787.

[1]) *O. Folin*, Approximatly complete analyses of thirty ‚normal' urines. American Journal of Physiology. Vol. 13, S. 66, 1905.

Harnsäure.

(Vgl. *Folins* Methode: Dieses Handbuch, Bd. III, 2, S. 889.)

Die Harnsäurebestimmung sollte an dem Tage beginnen, an dem der Harn gesammelt ist. Wenn aber einmal mit Ammoniumsulfat und Ammoniak beiseite gesetzt ist, schadet es nicht, wenn die Bestimmung erst nach einigen Tagen beendet wird. Zweitägiges Stehenlassen ist übrigens empfehlenswert. Wenn mehrere aufeinanderfolgende 24stündige Harnmengen zu analysieren sind, kann der letzte Teil der Bestimmung, das ist die Filtration und Titration, vorteilhaft verschoben werden, bis wenigstens fünf oder sechs Bestimmungen zusammen vorgenommen werden können.

Purinbasen.

Die beste zu Gebote stehende Methode für die Bestimmung der Purinbasen im Urin ist wahrscheinlich diejenige von *Krüger* und *Schmid* (Bd. III, 2, S. 886). Selbst diese Methode ist aber nicht so zuverlässig, wie es wünschenswert wäre. Ein befriedigender Beweis dafür, daß die Stickstoffkolloide des Harns nicht zum Teil als Purinbasen bestimmt werden, ist noch nicht geliefert worden. Es ist auch möglich, daß unter Umständen die Summe der Harnsäure und der Purinbasen, die durch diese Methode erhalten wird, geringer ist als der Wert, welcher sich für die Harnsäure allein nach der oben angegebenen Ammoniumsulfatmethode ergibt. Da ferner die Bestimmung mehr als ein Viertel der gesamten 24stündigen Urinmenge verlangt, paßt diese Methode nicht sehr gut in den Plan der vollständigen Harnanalyse, den wir in diesem Kapitel verfolgen. Weitere Modifikationen der Methode zwecks einer allgemeineren Anwendung sind sehr nötig.

Anorganische Sulfate, ätherische Sulfate und „neutraler" Schwefel.

Bei der Bestimmung der Sulfate im Urin werden die zuverlässigsten Resultate erhalten, wenn man die anorganischen Sulfate direkt nach der *Folin*schen Methode ermittelt (Bd. III, 2, S. 799). Die gesamten Sulfate sind vielleicht am leichtesten zu bestimmen nach der zweiten *Folin*schen Methode, welche in demselben Band (S. 799) beschrieben ist. Die *Salkowski*sche Methode (S. 797) ist auch gebrauchsfähig, aber es sollten bei Anwendung dieser Methode folgende Vorsichtsmaßregeln beobachtet werden: Erstens ist es besser, den Urin nicht auf dem Wasserbade zu erhitzen, ehe man vom Baryumsulfat abfiltriert; zweitens ist es nicht ratsam, das Baryumsulfat feucht mit Alkohol zu waschen, da sonst etwas von dem Niederschlag durch das Filter geht; drittens sollten immer Gooch-Tiegel für Sulfatbestimmungen benutzt werden, und viertens geben 25 cm^3 Urin ebenso genaue Resultate für Sulfate als 100 cm^3.

Die Menge der Totalsulfate minus derjenigen der anorganischen Sulfate ergibt die ätherischen Sulfate.

Der Gesamtschwefel minus desjenigen der Gesamtsulfate gibt den sogenannten Neutralschwefel.

Alle die verschiedenen Fraktionen sollten auf Schwefel umgerechnet werden und nicht auf SO_3 oder H_2SO_4.

Gesamtschwefel.

Jede der Natriumperoxyd-Methoden, die auf S. 795—96, Bd. III, 2 dieses Handbuches beschrieben worden sind, gibt ziemlich genaue Resultate. Das von *Folin* angegebene Verfahren, S. 796, gibt gewiß zuverlässige Resultate, vorausgesetzt, daß der Baryumsulfatniederschlag zwei Tage vor der Filtration gestanden hat.

Benedicts Methode [1]), die durch *Denis* [2]) modifiziert wurde, ist geeigneter als irgend eine der Peroxydmethoden und scheint ebenso genaue Resultate zu geben wie das *Folin*sche Verfahren. Diese Methode wird wie folgt ausgeführt.

Zu 25 cm^3 Urin, welche sich in einer Porzellanverdampfungsschale von ungefähr 12 cm Durchmesser [3]) befinden, fügt man mittelst einer Pipette oder Bürette 5 cm^3 einer Lösung, die 25% Kupfernitrat (kristall.), 25 cm^3 Natriumchlorid und 10% Ammoniumnitrat enthält. Es wird auf dem Dampfbad oder über einer kleinen Flamme zur Trockene verdunstet, dann gelinde mit einer schwachen Flamme erhitzt und nun allmälig der Gasstrom verstärkt, bis die Schale zur Rotglut erhitzt ist. Die letztere Temperatur wird 10—15 Minuten unterhalten. Man läßt nun abkühlen und fügt 10—20 cm^3 10%iger Salzsäure hinzu. Nachdem man einige Minuten gelinde erwärmt hat, resultiert eine klare Lösung. Man gießt jetzt in einen Erlenmeyerkolben von 200 cm^3 Inhalt, füllt mit Wasser bis 100 oder 150 cm^3 auf, erhitzt bis zum Kochen und fügt tropfenweise 25 cm^3 einer 10%igen Baryumchloridlösung hinzu. Dann läßt man einige Stunden stehen und filtriert hierauf in einem tarierten Gooch-Tiegel. Es muß ein Kontrollversuch mit 10 cm^3 der oxydierenden Lösung ausgeführt werden, da Kupfernitrat gewöhnlich Spuren von Sulfat enthält. Die Menge des so gefundenen Sulfates muß beim Endresultat berücksichtigt werden.

Indikan.

Die quantitativen Methoden, welche für die Bestimmung des Indikans vorgeschlagen wurden, sind ungeeignet, weil sie mehrere Hunderte Kubik-

[1]) *S. R. Benedict*, The estimation of total sulphur in urine. Journal of Biological Chemistry. Vol. 6. p. 363. 1909.

[2]) *W. Denis*, The determination of total sulphur in urine. Journal of Biological Chemistry. Vol. 8. p. 401. 1910.

[3]) Ungefähr 4·5 Zoll.

zentimeter Urin erfordern (vgl. Bd. III. 2. S. 843). In Ermangelung irgend einer exakten quantitativen Methode wird das folgende Verfahren (*Folin*), trotzdem es noch unvollkommen ist, in Amerika ausschließlich gebraucht. Es gibt immerhin wertvollen Aufschluß.

Zu einem Hundertstel der 24stündigen Urinmenge, in einem Reagenzrohr (von 25—30 cm^3 Inhalt) befindlich, fügt man 2 cm^3 einer 10%igen Kupfersulfatlösung und 5 cm^3 Chloroform hinzu. Dann füllt man das Reagenzglas mit konzentrierter Salzsäure und schließt die Öffnung des Rohres mit dem Daumen (Gummihütchen), stülpt einigemal um, bzw. man wartet, bis die Chloroformschicht die intensivste Farbe erreicht hat. Der Farbenton wird dann mit demjenigen der *Fehling*schen Lösung verglichen, die man als Standardlösung gebraucht und die mit dem Wert 100 bezeichnet wird. Der Vergleich wird so ausgeführt, daß man 10 cm^3 einer frischen *Fehling*schen Lösung in ein zweites Reagenzglas von derselben Größe gießt und dann die zwei Reagenzgläser nebeneinander hinter einem Schirm hält, so daß nur die Chloroformschicht am Grunde des ersten Reagenzglases und ein entsprechender Teil des zweiten Reagenzrohres unter dem Schild sichtbar sind. Wenn die blaue Farbe der *Fehling*schen Lösung tiefer ist als die der Indikanlösung, wird die erstere Probe mit einer abgemessenen Menge Wasser verdünnt, bis die beiden Färbungen annähernd gleich sind. Wenn die Chloroformlösung die intensivere Farbe zeigt, wird ähnlich wie vorher mit einer abgemessenen Menge Chloroform verdünnt. Die für das Indikan so erhaltenen Werte werden einfach mit 20, 50, 100, 125 etc. ausgedrückt.

Es ist unmöglich, diese Farbvergleichung exakter zu gestalten. Wenn man die Farbe der Indikanlösung mittelst eines Kolorimeters prüft, ist sie sehr verschieden von derjenigen der *Fehling*schen Lösung, selbst wenn sie rein blau erscheint.

Phosphate.

Die volumetrische Bestimmung der Phosphorsäure im Urin durch direkte Titration mit einer Normal-Uranlösung ist leicht, schnell und genügend genau auszuführen, wenn man die erforderlichen Normallösungen zur Hand hat.

Die Substanz, welche als Ausgangsmaterial für die Darstellung der Normallösungen am geeignetsten ist, ist unzweifelhaft das zweifachsaure Kaliumphosphat, KH_2PO_4. Es scheint schwierig zu sein, dieses Salz käuflich rein zu erhalten, aber es wird leicht, wie folgt, in reinem, kristallinischem Zustande gewonnen:

Zu 200 cm^3 Wasser, in einem Literbecherglas befindlich, fügt man 100 *g* reiner, konzentrierter Phosphorsäure (85%) und einige Tropfen Methylorangelösung. Man erhitzt die Lösung auf ungefähr 90° und setzt dann nach und nach reines, wasserfreies Kaliumkarbonat hinzu, bis die Lösung die deutliche, rote Färbung, welche sie der freien Phosphorsäure verdankt, zu verlieren beginnt. Wenn dieser Punkt erreicht ist, versetzt

man noch mit etwas Phosphorsäure (1—3 *cm*³), damit sicher ein geringer Überschuß an Säure vorhanden ist. An der warmen Lösung fügt man langsam unter Umrühren ungefähr 100 *cm*³ Alkohol hinzu, kühlt einige Minuten lang unter fließendem Wasser und filtriert dann durch einen Büchnertrichter ab. Man wäscht nun mit Alkohol 4- oder 5mal nach und trocknet zwischen Filtrierpapier. Ausbeute 110—120 *g*. Das so erhaltene kristallinische Salz ist reines KH_2PO_4 und enthält kein Kristallwasser. Die daraus bereiteten Standard-Phosphatlösungen bleiben fast unbeschränkt unverändert.

Eine Lösung, welche 2 *mg* Phosphor (P) auf 1 *cm*³ enthält, wird gewonnen, indem man 8·78 *g* KH_2PO_4 in Wasser löst und dann zum Liter auffüllt.

Die Standard-Uranlösung wird am besten aus reinem Uranazetat dargestellt. Man löse 30 *g* in ungefähr 1 *l* Wasser, füge 50 *cm*³ Eisessig hinzu und lasse die Lösung einige Tage lang stehen, so daß sich die ungelöste Substanz zu Boden setzt. Man ziehe nun die klare, oben aufschwimmende Lösung so vollständig wie möglich ab. Diese Lösung muß jetzt so eingestellt werden, daß 25 *cm*³ derselben genau gleich 25 *cm*³ der obigen Phosphatlösung entsprechen, so daß 1 *cm*³ 2 *mg* P entspricht. Die erforderliche Titration wird, wie folgt, ausgeführt: Man mißt 25 *cm*³ Phosphatlösung in einen 200 *cm*³-Erlenmeyerkolben und setzt 25 *cm*³ einer Lösung hinzu, welche ungefähr 6 *g* Natriumchlorid, 4 *g* Kaliumchlorid, 1 *g* Ammoniumchlorid und 10 *g* Natriumazetat pro Liter enthält. Nun wird die verdünnte Phosphatlösung zum Sieden erhitzt und während sie noch heiß ist, in die Uranlösung aus einer Bürette zufließen gelassen, bis zwei Tropfen der heißen Mischung, die man mittelst eines in eine Spitze ausgezogenen Glasrohres entnommen hat, auf einer Porzellanplatte mit ein wenig pulverisiertem Ferrocyankalium eine schwache, aber deutlich rötliche Farbe hervorrufen. Unter Zugrundelegung der Titrationswerte wird die Uranlösung verdünnt, so daß sie genau der Phosphatlösung entspricht.

Zur Bestimmung der Phosphate im Urin mißt man 50 *cm*³ in einen Erlenmeyerkolben, erhitzt zum Sieden und titriert wie vorher bei der Phosphatlösung, d. h. bis zwei Tropfen der Mischung mit etwas pulverisiertem Ferrocyankalium die Anwesenheit einer Spur unverbrauchten Uranazetates anzeigen. Wenn bereits zuviel Uranazetat vorhanden ist, kann die Titration noch so durchgeführt werden, daß man 2 *cm*³ der Standard-Phosphatlösung zufügt und nach dem Erhitzen bis zum Sieden wieder mit der Uranlösung titriert.

Chlor.

*Volhard*sche Methode. Diese ausgezeichnete und genaue, allgemein gebräuchliche Methode ist jeder anderen für die Bestimmung des Chlors im Urin überlegen.

Erforderliche Lösungen:

1. $\frac{n}{10}$-Silbernitrat (16·99 *g* im Liter).

2. $\frac{n}{10}$-Ammoniumthiocyanat. Es werden 8—9 *g* des reinen Salzes in 1000—1100 *cm*³ Wasser gelöst. Diese Lösung wird dann unter Zuhilfenahme der Titration mit der Silbernitratlösung und durch Hinzufügen der erforderlichen Menge Wasser zehntelnormal gemacht.

3. Eisenalaun (gesättigte Lösung).

4. Salpetersäure (1 Teil konzentrierter HNO_3 und 3 Teile Wasser). Man muß aufkochen, um die Stickstoffoxyde zu entfernen und dann vor Licht geschützt aufbewahren.

Die Titration wird, wie folgt, ausgeführt:

Man mißt 10 *cm*³ Urin in einen 100 *cm*³-Stöpselkolben (Glas) und fügt 20—30 *cm*³ Wasser, 20 *cm*³ Salpetersäure, 2 *cm*³ Alaunlösung und 20 *cm*³ Silbernitratlösung in genannter Reihenfolge hinzu. Man schüttelt nun ein wenig, damit sich der Chlorsilberniederschlag zusammenballt. Jetzt füllt man den Meßkolben bis zur Marke mit Wasser. Dann wird zugestöpselt, und der Kolben einige Male umgedreht, damit sich die Flüssigkeit vollständig mischt. Man gießt darauf durch ein trockenes Filter und entnimmt mit einer Pipette 50 *cm*³ für die Titration. Der Überschuß des Silbernitrates wird mit der $\frac{n}{10}$-Thiocyanatlösung titriert. Der Endpunkt, eine rötliche Färbung, ist sehr scharf.

Dieses Verfahren schließt eine kleine Ungenauigkeit ein wegen des Volumens, welches der Chlorsilberniederschlag in dem Meßkolben einnimmt, aber sie ist so gering, daß sie vernachlässigt werden kann.

Anstatt den Überschuß des Silbernitrates in einer filtrierten Portion der Mischung zu titrieren, kann man auch das Ganze in Gegenwart des Silberchlorids titrieren. Dieses Verfahren erfordert keinen Meßkolben und erspart auch die Filtration. Diese vereinfachte Methode ist aber weniger genau und gibt Werte, welche 1—5% zu niedrig sind.

Natrium und Kalium.

Lehmann, *Bunge*, *Salkowski*, *Munk* und *Neumann* haben Zusatz verschiedener Reagenzien zum Urin empfohlen, ehe Verdampfung und Oxydation, die für die Bestimmung des Natriums und Kaliums erforderlich sind, vorgenommen werden. Das einfache Verfahren, den Urin zu verdampfen und zu veraschen ohne irgend einen Zusatz, ergibt aber auch durchaus befriedigende Resultate.

Man verdampfe 50 *cm*³ Urin in einer Platinschale (von ungefähr 250 *cm*³ Inhalt) zur Trockene, erhitze den Rückstand eine Stunde lang, anfangs sehr vorsichtig, bis zur schwachen Rotglut über einem Radialbrenner (wie es bei der Mineralazidität-Bestimmung beschrieben ist, vgl. S. 284). Man kühlt nun ab, setzt 20 *cm*³ Wasser hinzu, verdunstet und erhitzt wieder eine Stunde lang über dem Radialbrenner bis zur schwachen Rotglut. Es bleibt dann nur eine geringe Menge Kohle zurück. Jetzt löse man die Salze in heißem Wasser und einigen Tropfen Salzsäure. Dann füge man einen Überschuß von gesättigter Barytumhydratlösung hinzu und erhitze

zum Sieden. Hierdurch werden Ca, Mg, H_3PO_4 und H_2SO_4 abgeschieden. Es wird auf einem Gooch-Tiegel filtriert und mit heißem Wasser ausgewaschen. Der Überschuß an Baryum wird nun zunächst aus dem alkalischen Filtrat mittelst gewaschenen Kohlensäuregases gefällt; dann wird durch einen Gooch-Tiegel filtriert und ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser werden mit verdünnter Salzsäure angesäuert, indem man sich eines Tropfens Methylorange als Indikator bedient.

Nun hat man eine Lösung von Natrium- und Kaliumchloriden. Diese Lösung wird in einer tarierten Platinschale verdampft und. wenn trocken, wird der Rückstand 10 Minuten lang allmählich bis zur gelinden Rotglut erhitzt. Dann läßt man in einem Exsikkator 20 Minuten lang abkühlen und wiegt. Die Gewichtszunahme entspricht dem Natrium- und Kaliumchlorid.

Das Kalium muß jetzt in dem Salzgemisch getrennt bestimmt werden. Die gewöhnliche Platinchloridmethode ist im allgemeinen vorzuziehen; ebensogute Resultate werden aber auch mit der Überchlorsäuremethode erhalten.

Man löst die Chloride in einer sehr geringen Menge Wasser auf und setzt einige Tropfen verdünnter Salzsäure hinzu. Dann fügt man einen Überschuß von Platinchlorid, 4—5mal so viel H_2PtCl_6 als das gesamte Gewicht der Salze beträgt, in einer 10%igen Lösung hinzu und läßt bei niedriger Temperatur (75° C) verdampfen, bis der Schaleninhalt nach dem Erkalten trocken erscheint. Jetzt wird 95%iger Alkohol zugegeben, durch einen Gooch-Tiegel filtriert, mit Alkohol gewaschen und bei 110° getrocknet und dann gewogen. Das Gewicht des Kaliumchlorplatinats multipliziert mit dem Faktor 0·3056 gibt das entsprechende Gewicht des Kaliumchlorids. Diese Zahl subtrahiert von dem ursprünglichen Gewicht der Chloride ergibt das vorhandene Natriumchlorid.

Calcium und Magnesium.

Gemäß der kürzlich von *Mc Crudden* ausgeführten Verbesserung der alten *Fresenius-Neubauer*schen Methode wird die Bestimmung des Calciums und Magnesiums wie folgt vorgenommen.[1])

Zu 200 *cm*³ Urin, in einem Erlenmeyerkolben befindlich, werden zwei Tropfen einer 1%igen, roten Alizarinlösung gefügt, dann wird vorsichtig tropfenweise verdünnte Salzsäure zugesetzt, bis die Farbe des Indikators anfängt gelb zu werden. Zu dem neutralen oder etwas sauren Urin gibt man zunächst 10 *cm*³ einer annähernd 2%igen Salzsäure und 10 *cm*³ einer 2·5%igen Oxalsäure hinzu. Dann erhitzt man sorgfältig zum Sieden, bis der Calciumoxalatniederschlag ein körniges Aussehen zeigt. Zu der gelinde siedenden Lösung werden 10—15 *cm*³ einer 3%igen Ammoniumoxalatlösung gefügt, und zwar so, daß man von Zeit zu Zeit auf einmal

¹) *F. Mc Crudden*, The quantitative separation of calcium and magnesium in the presence of phosphates and small amounts of iron devised especially for the analysis of foods, urine and feces. Journal of Biological Chemistry. Vol. 7. p. 82. 1910.

einige Tropfen zugibt. Auf diese Weise wird der größte Teil des Calciums bei deutlich saurer Reaktion niedergeschlagen und die gleichzeitige Bildung von Calciumphosphat verhindert. Die Mischung läßt man zur Abkühlung stehen. Wenn gänzlich abgekühlt, setzt man langsam 8 cm^3 einer 20%igen Natriumazetatlösung hinzu, indem man beständig rührt; dann läßt man die Mischung über Nacht stehen. Die Gefahr, einen Niederschlag zu erhalten, welcher mit Calciumphosphat verunreinigt ist, wird bei obigem Vorgehen vollständig beseitigt. Am folgenden Tage wird der Niederschlag auf einem kleinen aschfreien Filter gesammelt und mit einer kalten, 1%igen Lösung von Ammonoxalat gewaschen, bis das Waschwasser keine Chlorreaktion mehr gibt. Der Niederschlag wird dann getrocknet, in einem tarierten Platintiegel erhitzt und mit einem Gebläse geglüht, bis er vollständig in Calciumoxyd übergeführt ist.

Zu dem in eine Porzellanschale gegossenen Filtrat und Waschwasser, welche Flüssigkeiten das Magnesium enthalten, werden 20 cm^3 konzentrierter Salpetersäure gegeben. Das Gemisch wird dann fast bis zur Trockene verdampft. Wenn ziemlich trocken und wenn keine Stickoxyde mehr entweichen, setzt man 10 cm^3 konzentrierter Salzsäure hinzu und verdunstet die Lösung wieder fast zur Trockene. Nach Verdünnung mit Wasser auf ungefähr 80 cm^3 versetzt man unter beständigem Umrühren tropfenweise mit Ammoniak, bis die Lösung alkalisch ist. Dann werden 25 cm^3 verdünnten Ammoniaks (sp. Gew. 0·96) langsam unter Rühren zugesetzt und schließlich wird die Mischung (an einem kühlen Orte) über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag wird nun auf einem kleinen Filter gesammelt und mit alkoholischer Ammoniaklösung (1 Teil Alkohol, 1 Teil verdünnten Ammoniaks, 3 Teile Wasser) frei von Chloriden gewaschen. Der getrocknete Niederschlag und das Filterpapier werden in einem gewogenen Platintiegel geglüht. Nach dem Abkühlen wird das Magnesiumpyrophosphat, $Mg_2P_2O_7$, gewogen.

Nachweis und Bestimmung der Eiweißabbauprodukte im Harn.

Von **P. Rona**, Berlin.

Bestimmung des Gesamtstickstoffs.

Bestimmung nach *Kjeldahl* vgl. Band I, S. 340.

Nach Untersuchungen von *C. C. Erdmann*[1]) können stickstoffhaltige Verbindungen, die die Gruppen $= N . CH_3$, $- NH . CH_3$ oder $= N(CH_3)_3$ enthalten, bei der Digestion mit H_2SO_4 nach *Kjeldahl* Mono-, Di- oder Trimethylamin liefern. Die Bestimmung von Alkylamin neben Ammoniak läßt sich in der Weise bewirken, daß man nach dem Aufschluß mit H_2SO_4 und Katalysator zunächst die Gesamt-N-Menge durch Titration des in $\frac{1}{10}$-n-Säure überdestillierten Gemisches mit $\frac{1}{10}$-n-NaOH ermittelt. Dann fügt man zu der neutralen Flüssigkeit 5—10 cm^3 einer Mischung von 20%iger NaOH und 30%iger Sodalösung hinzu, füllt bis zur Marke auf 250 oder 500 cm^3 auf, fügt für jeden Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$-n-NH_3 0·1 *g* gelbes HgO hinzu, schüttelt eine Stunde bei Lichtabschluß, läßt 12 Stunden lang absitzen, filtriert durch Watte und bestimmt in 200 oder 250 cm^3 des Filtrates das Alkylamin durch Destillation und Titration. Die Menge des durch HgO absorbierten Ammoniaks ergibt sich aus der Differenz.

Bei der Bestimmung des Stickstoffs nach *Kjeldahl* in fetten Substanzen empfiehlt *J. A. Brown*[2]), um das lästige Schäumen zu vermeiden, die Substanz nach der Behandlung mit H_2SO_4 auf 100 cm^3 mit Wasser zu verdünnen, auf 40 cm^3 einzudampfen und dann mit Alkali zu destillieren.

C. Beger[3]) empfiehlt den Aufschluß von fettreicher Milch in einem langhalsigen Rundkolben mit 30 cm^3 Phosphorschwefelsäure und einem Tropfen Hg vorzunehmen. Den Hals des Kolbens und einen Teil des Kol-

---

[1]) *C. C. Erdmann*, Über Alkylamine als Produkte der *Kjeldahl*-Behandlung. Journ. Biolog. Chem. 8. 41 (1910); Chem. Zentralbl. 1910. II. 760. Vgl. auch Journ. Biol. Chem. **9**. 85 (1911).

[2]) *J. A. Brown*, Notiz über die Bestimmung des N nach *Kjeldahl* in fetten Substanzen. Chem. News. **102**. 51 (1910).

[3]) *C. Beger*, Aus der analytischen Praxis. Zeitschr. f. analyt. Chemie. **49**. 427 (1910).

benbauches umgebe man mit einem Belag von Bleiblech. Der Aufschlußkolben steht auf einem Stativ unter einem Winkel von 45° geneigt und die Mündung rage in einen mit Bleiröhren versehenen Abzug.

Die *Kjeldahl*sche Methode ist wohl in ihrer ursprünglichen Form, wie auch speziell in *Gunnings* Modifikation (Anwendung von K_2SO_4) mit einem Fehler behaftet, so daß die Stickstoffwerte ein wenig zu niedrig ausfallen (*R. Koefoed*[1]). Der Grund hierfür ist, daß während der Zersetzung mit Säure durch Verdampfung oder noch wahrscheinlicher infolge Zersetzung des Ammoniumsulfats ein Verlust an Stickstoff entsteht. Man soll, um diese Verluste zu vermeiden, die Stickstoffbestimmung womöglich nach der ursprünglich von *Kjeldahl* angegebenen Form ausführen und die Dauer der Erwärmung (3—5 Stunden) nicht unnötig verlängern. Wo das von *Kjeldahl* angegebene Verfahren nicht genügt, wo aber die Zersetzung nach *Gunning* vorgenommen werden kann, soll nach *Koefoed* die Dauer der Erwärmung möglichst abgekürzt werden.

Nach *A. C. Andersen*[2]) ist Platinchlorid als Katalysator zu verwerfen, da es erhebliche Stickstoffverluste verursacht.

Bei Bestimmungen nach *Kjeldahl* wird nach der Beschreibung von *Koefoed* der zu untersuchende Stoff mit 10 *cm*³ konzentrierter H_2SO_4 und 0·25 *g* CuO 3—5 Stunden erwärmt, die Flüssigkeit mit fein gepulvertem $KMnO_4$ oxydiert und in den von *Kjeldahl* angegebenen Kupferkolben[3]) mit ca. 200 *cm*³ Wasser gebracht. Mit 50 *cm*³ ca. 33°/₀iger Natronlauge wird soviel abdestilliert, daß sich in der Vorlage 100 *cm*³ sammeln. Bei Bestimmungen nach *Kjeldahl-Gunning* wird nach der im Carlsberg-Laboratorium geübten Weise die Substanz ½ Stunde mit 20 *cm*³ H_2SO_4, 5 *g* K_2SO_4 und 0·5 *g* CuO erwärmt; dann werden noch 15 *g* K_2SO_4 hinzugefügt und die Zersetzung ohne Oxydation mit Kaliumpermanganat durchgeführt. Bei der Destillation werden 70 *cm*³ Natronlauge verwendet.

Erfolgt der Säureaufschluß bei der *Kjeldahl*-Methode in Gegenwart einer Quecksilberverbindung, so muß für eine Zerlegung des gebildeten Amidomerkurisulfats $Hg(NH_3)_2SO_4$ gesorgt werden, was vorteilhaft mit dem von *C. Neuberg* empfohlenen Natriumthiosulfat geschehen kann. Wird jedoch zu der noch schwefelsauren Flüssigkeit das Natriumthiosulfat hinzugefügt, so kann ein Teil der flüchtigen schwefeligen Säure in die Vorlage gelangen und so deren Säuretiter erhöhen. Um von vornherein diesem Fehler vorzubeugen, empfiehlt *C. Neuberg*[4]) neuerdings an Stelle des

[1]) *R. Koefoed*, Einige Bemerkungen über die jodometrische Säuretitrierung und über *Kjeldahls* Stickstoffbestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**. 421 (1910).

[2]) *A. C. Andersen*, Einige Bemerkungen über N-Bestimmung nach *Kjeldahl*. Skand. Arch. f. Phys. **25**. 96 (1911).

[3]) Über den Einfluß des Glases bei dem *Kjeldahl*-Verfahren vgl. *E. Jalowetz*, Wochenschr. f. Brauerei. **21**. 393 (1904). — *H. T. Brown*, Ebenda. **21**. 165 (1904). — *K. Bartelt* und *H. Schönewald*, Ebenda. **21**. 523 und 793 (1904).

[4]) *C. Neuberg*, Zur Ausführung der *Kjeldahl*-Bestimmung. Biochem. Zeitschr. **24**. 435 (1910).

Natriumthiosulfats das gleichfalls feste Kaliumxanthogenat ($C_2H_5O.CSSK$) anzuwenden, und zwar etwa 1·0 *g* für 0·4 *g* HgO. Das xanthogensaure Kalium liefert selbst bei saurer Reaktion nichts ins Destillat, was den Titer verändert. In alkalischer Lösung zerlegt es das Amidomerkurisulfat glatt wie Alkalisulfid.

Die von *Kjeldahl* ausgearbeitete jodometrische Säuretitrierung wird im Carlsberg-Laboratorium folgendermaßen ausgeführt[1]): Das Titrieren wird immer in demselben Flüssigkeitsvolumen (100 *cm*³) vorgenommen, und zwar so, daß man bei der Ammoniakdestillation so viel in die in einem Erlenmeyerkolben vorgelegte Säure (15 *cm*³ ca. $\frac{1}{7}$-n-H_2SO_4) überdestilliert, daß die totale Flüssigkeitsmenge 100 *cm*³ beträgt; wird Destillation nicht vorgenommen, so wird mit ausgekochtem, destilliertem Wasser bis 100 *cm*³ aufgefüllt. Man gibt dann 10 *cm*³ 5%iger Kaliumjodidlösung, 2 *cm*³ 2%iger Stärkelösung (mit NaCl gesättigt) und endlich 2 *cm*³ 4%iger Kaliumjodatlösung und beendet das Titrieren immer binnen derselben Zeit. Zweckmäßig verwendet man, um die genaue Zeit zu bestimmen, ein Minutenglas für zwei Minuten, welches gleichzeitig mit dem Kaliumjodatzusatz in Betrieb gesetzt wird; im Anfang kann die Thiosulfatlösung ziemlich schnell in den Kolben laufen, wenn man durch Schütteln für gute Mischung sorgt; wenn aber die Farbe rein dunkelblau geworden ist, setzt man nur tropfenweise zu. Es ist unnötig, die genaue Stärke der verwendeten ca. $\frac{1}{7}$-n-Säure zu kennen, dagegen muß die Stärke der Thiosulfatlösung mit möglichst großer Genauigkeit bestimmt werden. Als Urtitersubstanz verwendet man mit großem Vorteil Natriumoxalat (*S. P. L. Sörensen*). Eine abgewogene Menge dieses im Vakuum über H_2SO_4 getrockneten Salzes wird nach *Sörensen* über eine Spiritusflasche dekomponiert, in eine bestimmte Säuremenge aufgelöst und die Kohlensäure durch Kochen verjagt. Der Minderverbrauch an Thiosulfat, den das in dieser Weise teilweise gesättigte Volumen Säure gegen den Thiosulfatverbrauch derselben Säuremenge zeigt, gibt den Titer der Thiosulfatlösung. Verwendet man a *g* $Na_2C_2O_4$ und beträgt der Minderverbrauch b *cm*³ Thiosulfatlösung, so ist diese

$$\frac{100 \times 28{\cdot}02 \times a}{134{\cdot}00 \times b} \cdot \frac{\text{normal}}{14{\cdot}01}.$$

Nach *Lunge* kann man auch wasserfreies Natriumkarbonat verwenden. Eine abgewogene Menge entwässertes Salz wird zur teilweisen Sättigung einer bestimmten Säuremenge benutzt; wenn man a *g* Na_2CO_3 verwendet und der Minderverbrauch an Thiosulfat b *cm*³ beträgt, so wird die Thiosulfatlösung

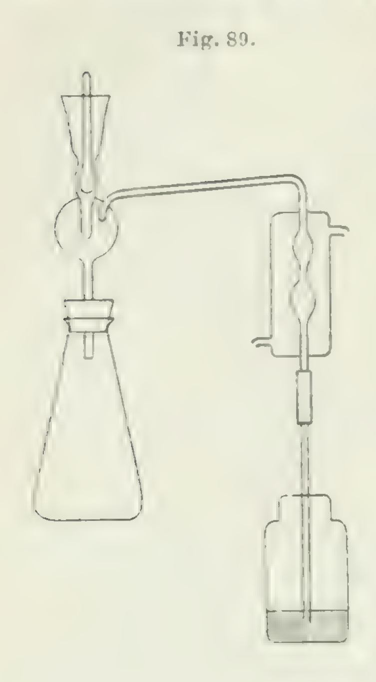
$$\frac{100 \times 28{\cdot}02 \times a}{106{\cdot}00 \times b} \cdot \frac{\text{normal}}{14{\cdot}01}.$$

Was den bei der azidimetrischen Titrierung angewandten Indikator betrifft, so bestätigt *de Jager* die gute Anwendbarkeit des von *Spaeth*

[1]) Vgl. *R. Koefoed*, l. c.

empfohlenen Luteols (0·2⁰/₀ige alkoholische Lösung. Zu 50 cm^3 Flüssigkeit setzt man 4—5 Tropfen). Hat man den Ammoniakgehalt durch Sättigung der überschüssigen H_2SO_4 bestimmt unter Anwendung von Luteol, so kann man nach Zusatz von Phenolphtalein, das auch sofort zugesetzt werden kann, den Gehalt an Ammoniak auch noch nach der Formolmethode bestimmen.[1]) *A. W. Bosworth* und *W. Eissing*[2]) empfehlen die Titration mit $^1/_{14\cdot04}$ n-Lauge vorzunehmen. Einem Kubikzentimeter Lauge entsprechen 1 *mg* N; die Berechnung wird daher sehr vereinfacht.

Fig. 89.



Hinsichtlich der Apparatur sind verschiedene Vorschläge gemacht worden.[3]) Einen praktischen Destillationsaufsatz zur Ammoniakbestimmung empfiehlt *A. Berthold*[4]) (vgl. Fig. 89).

Die Lauge wird dabei in den Laugentrichter eingefüllt und durch geringes Anheben des Schlußstiftes nur so viel Lauge in den Kolben gelassen, daß noch ein Flüssigkeitsverschluß bestehen bleibt.

* *
*

Zur Bestimmung des N in Substanzen, die den Stickstoff in Form von Nitraten, Nitriten, Nitro-, Nitroso-, Azo-, Diazo-, Hydrazin-, Zyan-Verbindungen enthalten, verfährt man nach den S. 356 (Band I) beschriebenen Verfahren.

Als Ergänzung mögen noch folgende Methoden hier erwähnt werden:

Zur Bestimmung des Stickstoffs in Phenylhydrazin, Hydrazonen und Osazonen verfährt *J. Milbauer* wie folgt.[5])

0·2 *g* Substanz werden in einem Kolben in 50 cm^3 Wasser gelöst, mit 3 *g* in 1⁰/₀iger Schwefelsäure gewaschenem Zinkpulver versetzt und hierauf werden durch einen Glastrichter langsam 50 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure zugegeben. Die Flüssigkeit wird vorsichtig auf dem Drahtnetze erhitzt, so daß eine zu heftige Wasserstoffentwicklung vermieden wird. Nach beendeter Reduktion wird ein Tropfen Quecksilber hinzugegeben und bis zur vollständigen Entfärbung zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen der Flüssigkeit auf 100° werden 2 *g* Kaliumpersulfat hinzugesetzt; darauf wird weiter erhitzt, nach etwa $^1/_2$ Stunde, wenn die Flüssigkeit vollkommen klar

[1]) *L. de Jager,* Über Luteol. Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**. 115 (1910).

[2]) *A. W. Bosworth* und *W. Eissing,* Eine Bürette und Normallösungen für die N-Bestimmung nach *Kjeldahl.* Zeitschr. f. analyt. Chem. **42**. 711 (1903).

[3]) Vgl. hierzu auch „Ammoniak". — Einen neuen Aufsatz zur Ammoniakdestillation beschreiben *Heubner* und *Wiegner.* Journ. f. Landw. **57**. 385 (1910).

[4]) *A. Berthold,* Neuer Destillationsaufsatz zur Ammoniakbestimmung. Chem.-Ztg. **33**. 1292 (1910).

[5]) *J. Milbauer,* Über die quantitative Bestimmung des N in Hydrazonen und Osazonen nach *Kjeldahl.* Zeitschr. f. analyt. Chem. **42**. 725 (1903).

geworden ist, wird das gebildete Ammoniak wie beim *Kjeldahl*schen Verfahren bestimmt.

Die Bestimmung des Stickstoffes in Nitraten, Nitro- und Nitrosoverbindungen ist nach *M. Krüger* folgendermaßen auszuführen:

0·1—0·3 *g* Substanz werden in einem Rundkolben mit etwa 20 cm^3 Wasser oder bei in Wasser schwer löslichen Körpern mit 20 cm^3 Alkohol, darauf mit 10 cm^3 Zinkchlorürlösung und 1·5 *g* Zinnschwamm versetzt. Alsdann erwärmt man über kleiner Flamme bis zur vollständigen Entfärbung des Gemisches und bis zur Lösung des Zinns. Ist diese erfolgt, so fügt man vorsichtig nach dem Erkalten der Flüssigkeit und, wenn Alkohol angewendet war, nach seiner Verdunstung 20 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure hinzu, dampft bis zur Entwicklung reichlicher Schwefelsäuredämpfe ein und verbrennt weiter wie beim *Kjeldahl*schen Verfahren.

Die Reduktion von Nitrat-N zum Ammoniak-N vollzieht sich sehr glatt, wenn man als Reduktionsmittel Aluminiumschnitzel verwendet, vor allem in Gegenwart von Quecksilber als Katalysator. Man bringt die betreffende Substanz in einen Destillationskolben, setzt 5—6 *g* Aluminium und 2 cm^3 einer gesättigten $HgCl_2$-Lösung, darauf 150—200 Wasser zu, läßt nach beendigter Reaktion Lauge zu und fängt das Ammoniak in der mit der n-Säure beschickten Vorlage auf. Gegen Ende der Destillation zerstört man die eventuell gebildete geringe Menge Merkuriammoniumverbindung durch einige Kubikzentimeter Natriumhypophosphitlösung. 1 cm^3 n-Säure entspricht 0·085 *g* $NaNO_3$ und 0·054 *g* N_2O_5 (*Pozzi-Escot*[1]).

Der Gesamtstickstoff im Harn läßt sich auch mit Vermeidung der Ammoniakdestillation nach dem *Kjeldahl*-Aufschluß mittelst der Formolmethode durchführen. Man wird allerdings kaum in die Lage kommen, die ohnehin einfache Abdestillation des Ammoniaks durch eine andere Methode zu ersetzen. *P. Rona* und *R. Ottenberg*[2]) geben hierzu folgende Vorschrift:

5 cm^3 Harn werden mit 10 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und 5—8 Tropfen einer 1%igen Platinchloridlösung als Katalysator aufgeschlossen[3]), mit ca. 100 cm^3 destilliertem Wasser quantitativ in einem

[1]) *Pozzi-Escot,* Reduktion der Salpetersäure zur Stufe des Ammoniakstickstoffs und ein neues Verfahren zur Bestimmung der Nitrate. Ann. Chim. anal. appl. **14**. 445 (1910); C. r. Acad. sc. **149**. 1380 (1910). — Vgl. auch *Salle,* Allgemeine Methode zur Bestimmung des Nitratstickstoffs. Ann. Chim. analyt. appl. **15**. 103 (1910). — Ferner *E. Cahen,* The Analyst. **35**. 307. — *C. Frabot,* Ann. Chim. anal. appl. **15**. 219. — Vorzüglich geeignet zur Reduktion zu Ammoniak in alkalischer Lösung ist die *Devarda*sche Legierung, die aus 50 Teilen Kupfer, 5 Teilen Zink und 45 Teilen Aluminium besteht. Noch energischer wirkt eine Legierung, die aus 59% Al, 39% Cu und 2% Zn besteht. Vgl. Zeitschr. f. analyt. Chem. **33**. 113; **38**. 56. — Bezüglich des Verfahrens der Stickstoffbestimmung in Bodenauszügen von *E. A. Mitscherlich* vgl. *Th. Zeller,* Landw. Versuchsstation. **71**. 437 (1910). — *Densch,* Chem.-Ztg. **33**. 1249 (1910). — Praktische Bemerkungen über die *Kjeldahl*-Methode findet man noch *C. H. Jones,* Journ. of Ind. and Engin. Chem. **2**. 546 und *P. L. Hibbard,* Ebenda. 463 (1910).

[2]) *P. Rona* und *R. Ottenberg,* Zur Methodik der Stickstoffbestimmung im Harn. Biochem. Zeitschr. **24**. 354 (1910).

[3]) Vgl. hierzu jedoch *A. C. Andersen,* l. c. S. 296.

ca. 350 *cm*³ fassenden Erlenmeyerkolben gespült, mit 6—7 Tropfen einer Lackmuslösung (Lackmus von *Kubel-Tiemann*, von *Kahlbaum* bezogen) versetzt, ca. 20 *cm*³ 33%ige NaOH hinzugefügt, dann an der Wasserleitung abgekühlt und nach dem Erkalten der Flüssigkeit weiter 33%ige Natronlauge zuerst kubikzentimeterweise, dann, wenn die blaue Farbe nicht mehr so schnell verschwindet (wenn nötig, unter Kühlung) tropfenweise hinzugegeben, bis die Farbe eben blau geworden ist. Dann macht man die Flüssigkeit mit $\frac{n}{5}$-Säure wieder schwach sauer oder neutral und fügt nun wieder bis zur deutlich blauen Farbe $\frac{n}{5}$-Lauge hinzu. Dann wird tropfenweise $\frac{n}{5}$-Säure hinzugefügt, bis eben die erste deutliche Abweichung nach dem Violett auftritt. Um diesen Punkt deutlich zu erkennen, muß man eine Vergleichslösung von rein blauer Farbe benutzen, die folgendermaßen hergestellt wird: 150 *cm*³ destilliertes Wasser werden mit 1 *cm*³ $\frac{n}{5}$-Natronlauge und 10 Tropfen Lackmus versetzt. Bei der Verwendung dieser Lösung ist der Umschlag stets mit Leichtigkeit erkennbar. Nun fügt man zu der so neutralisierten Lösung 30 *cm*³ Formaldehyd, das vorher unter Anwendung von Phenolphtalein gerade bis zur beginnenden Rosafärbung neutralisiert worden ist, titriert mit $\frac{n}{5}$-Lauge, fügt noch, sobald die Farbe beginnt blau zu werden, 1 *cm*³ einer ½%igen alkoholischen Phenolphtaleinlösung hinzu und titriert weiter bis zum ersten Auftreten der violetten Farbe, die als Mischfarbe von Lackmus und Phenolphtalein entsteht. Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter NaOH gibt direkt die entsprechende NH_3- bzw. Stickstoffmenge an. Die ganze Prozedur des Titrierens nimmt etwa 10 Minuten in Anspruch.

Die Methode läßt die Phosphate des Harnes unberücksichtigt. — Nach der Vorschrift von *de Jager*[1]) werden diese aus dem Harn zuerst entfernt. 40 *cm*³ Harn, 5 *g* Natriumazetat werden mit 10%iger Eisenchloridlösung bis zur rotbraunen Färbung versetzt, auf 50 *cm*³ mit Wasser aufgefüllt, durchgeschüttelt, die Flüssigkeit annähernd gewogen und nach dem Kochen bis zur völligen Ausflockung das verdampfte Wasser auf der Wage ersetzt. 10 *cm*³ Filtrat (= 8 *cm*³ Harn) werden wie üblich unter Zugabe von Kupfersulfat und Kaliumsulfat mit 5 *cm*³ konzentrierter H_2SO_4 zerstört. Das Reaktionsprodukt wird mit Wasser verdünnt und mit 10 *cm*³ 10%iger Natriumsulfidlösung zur Abscheidung des Kupfers so lange gekocht, bis der gesamte Schwefelwasserstoff entfernt ist. Hierauf wird auf 100 *cm*³ mit Wasser verdünnt und 50 *cm*³ Filtrat unter Anwendung von Phenolphtalein neutralisiert. Man macht zuerst schwach alkalisch und setzt dann tropfenweise $\frac{1}{10}$-n-Säure bis zur Entfärbung und $\frac{1}{10}$-n-Lauge bis zum ersten schwachen Rot zu. Nach

[1]) *de Jager*, Die Formoltitration zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs. Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**. 1 (1910).

Zugabe von 6 cm^3 neutralisiertem Formaldehyd wird wieder bis zum ersten schwachen Rot mit Lauge titriert. Die jetzt verbrauchten Kubikzentimeter Lauge geben die Ammoniakmenge direkt in $\frac{1}{10}$-n-Kubikzentimeter.

Bestimmung des Kohlenstoffs organischer Substanzen auf nassem Wege.

(Vgl. Band I, S. 359.)

Als Nachtrag zu den im ersten Band beschriebenen Verfahren sei die Methode, wie sie in der tierphysiologischen Versuchsstation in Budapest *(Fr. Tangl)* angewendet wird, genau beschrieben.[1])

Fig. 90.

Der aus Jenenser Glas geblasene, gut gekühlte Aufschließkolben (Fig. 90) ist ganz glatt, hat keinen angeschmolzenen Ansatz. Im Kolbenhals ist eine Schliffstelle, die ein luftdichtes Einsetzen des Kühlers ermöglicht. Zur Sicherung der Dichtung ist der obere Rand des Kolbens umgekrämpt, wodurch um den Kühler eine kreisförmige Rinne gebildet wird, die man mit einigen Tropfen konzentrierter H_2SO_4 anfüllt.

In den Kolben paßt luftdicht ein Kühleinsatz, der, wie die Figur zeigt, bis zur kugelförmigen Erweiterung des Kolbens herabreicht und sämtliche Ansätze trägt. Die Ansätze *a* und *b* dienen zum Zu- und Ableiten des strömenden Kühlwassers. Die mittlere Röhre *(c)*, die bis 10 bis 12 *mm* über den Boden des Kolbens reicht, setzt sich nach oben in eine kugelförmige Erweiterung fort, die in Längsschnitt in Fig. 90 abgebildet ist. Der seitliche Ansatz *(d)* dient zur Zuleitung der CO_2-freien Luft während der Verbrennung, die Schliffstelle im Halse *(e)* zum luftdichten Einsetzen des Glasstöpsels *(f)*; in den Trichter *(g)* wird die nötige Menge H_2SO_4 gegossen und durch leichtes Lüften des Glasstöpsels *(f)* in kleinen Portionen in den Kolben gelassen. Die überschüssige H_2SO_4, die im Trichter bleibt, dient zur Dichtung. Durch den Kühler geht auch die Röhre *(h)*, die seitlich unten

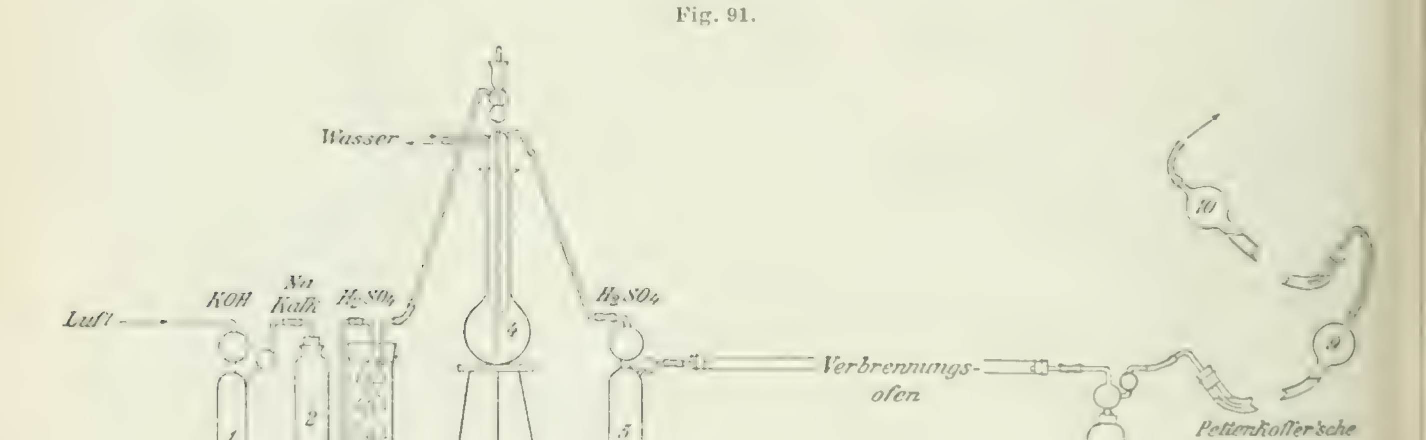
[1]) *Fr. Tangl* und *G. v. Kereszty*, Zur Methodik der Bestimmung des Kohlenstoffs organischer Substanzen auf nassem Wege. Biochem. Zeitschr. 32. 266 (1911). Herr Prof. *Tangl* hatte die Güte gehabt, das Manuskript dieser Mitteilung für die „Arbeitsmethoden" zur Verfügung zu stellen, wofür ihm auch an dieser Stelle gedankt sei. Die mitgeteilte Beschreibung ist ein wörtlicher Abdruck der wesentlichen Teile des Manuskriptes.

mündet und oben in einen Ansatz *(h)* ausläuft. Sie dient zum Ableiten der durch *d—e* zugeleiteten Luft. Der *Wüst*sche Kühler ist nur insofern modifiziert, als die Röhre *(h)* in den Kühler versetzt wurde, wodurch die chromhaltigen, flüchtigen Produkte besser zurückgehalten werden.

Die Zusammenstellung des ganzen Apparates zeigt Fig. 91.

Die mit 25%igen KOH-Lösung gefüllte Waschflasche *(1)* und der Natronkalkturm *(2)* reinigen die in den Apparat gesaugte Luft von CO_2, die H_2SO_4 in der Waschflasche *(3)* entwässert sie. Der Aufschließkolben *(4)* ist an einem Stativ über einen mit einer Asbestplatte bedeckten Dreifuß befestigt; unter dem Dreifuß befindet sich ein Bunsenbrenner, der in der Zeichnung nicht abgebildet ist. Die Waschflasche *(5)* enthält wenig konzentrierte H_2SO_4. Dann folgt ein Verbrennungsrohr in einem Verbrennungsofen, wie es zu Elementaranalysen verwendet wird. Die Verbrennungsröhre ist nur in einer Länge von 30—40 *cm* mit CuO-Asbest gefüllt. Dieser

Fig. 91.



Teil der Röhre wird wie bei der Elementaranalyse bis zum Glühen des CuO angeheizt. Hinter der angeheizten Strecke folgt eine etwa 6—8 *cm* lange Strecke, die mit körnigem PbO_2 gefüllt ist, das sich zwischen 2 Asbestpfropfen befindet. Dieser Teil der Röhre ist von einer mit einem Thermometer versehenen Metallkapsel umgeben, die von unten mit einem kleinen Bunsenbrenner angeheizt wird. (Der Verbrennungsofen ist in der Zeichnung nicht angegeben.)

Tangl benutzt einen elektrischen Ofen, doch kann natürlich ebenso gut ein mit Gasflammen geheizter verwendet werden. Neuerdings benutzt *Tangl* den *Pregl*schen [1]) Doppelofen, in dem 2 Verbrennungen gleichzeitig ausgeführt werden können. Er leistet in derselben Zusammenstellung mit derselben Röhrenfüllung, wie sie *Pregl* für die Elementaranalyse angibt, ausgezeichnete Dienste.

Nach der Verbrennungsröhre folgt eine Waschflasche *(8)*, die etwas mit H_2SO_4 angesäuertes Wasser enthält, damit die durchgesaugte Luft

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXVIII. II. 1905.

mit Wasserdampf gesättigt in die Barytröhre *(9)* tritt. Barytröhren sind zwei hintereinander geschaltet: die erste *(9)* faßt 300 *cm*³ Barytwasser, die zweite *(10)* kleinere 100 *cm*³. Letztere dient nur zur Kontrolle und vermittelt die Verbindung mit der Saugleitung resp. Wasserstrahlpumpe.

Die einzelnen Teile des Apparates sind mittelst möglichst kurzer Kautschukschlauchstücke miteinander luftdicht verbunden.

Vor allem überzeugt man sich davon, ob alle Teile des Apparates luftdicht schließen. Dann bringt man 8—10 *g* vorher bis zum Schmelzen erhitztes Kaliumbichromat in den Aufschließkolben, setzt den Kühler ein und saugt noch vor der Einschaltung der Barytröhren in langsamem Strom Luft durch den Apparat, um ihn vollständig mit CO_2-freier Luft zu füllen. Gleichzeitig wird der CuO enthaltende Teil der Verbrennungsröhre bis zur Rotglut, der PbO_2 enthaltende Teil auf 150—180° C erhitzt.

Nachdem der Apparat genügend durchventiliert ist (¹/₄—¹/₂ Stunde), werden die Barytröhren eingeschaltet und die zu verbrennende Substanz in den Aufschlußkolben gebracht. Soll eine feste Substanz verbrannt werden, so werden genau gewogene 0·1—0·3 *g* derselben eventuell in Stanniol gewickelt, nach Herausheben des Kühlers in den Kolben geworfen. Soll eine flüssige Substanz verbrannt werden, z. B. Harn, so kann man sie mittelst einer geeichten Pipette nach Entfernung des Stöpsels durch die Röhre *c* in den Kolben fließen lassen. Was an der Röhrenwand haftet, wird später durch die zufließende H_2SO_4 in den Kolben gespült. Vom Harn nimmt man gewöhnlich 5 *cm*³. Dann wird der Stöpsel *(f)* eingesetzt und in den Trichter *(g)* die H_2SO_4 gegossen.

Man erhitzt jedesmal die zur Verbrennung benutzte reine konzentrierte H_2SO_4 vorher längere Zeit, damit jede Spur eventuell darin vorhandener C-haltiger Substanzen zerstört werde. Aus demselben Grunde wird das Kalibichromat geschmolzen.

Nachdem der Wasserstrom durch den Kühler in Gang gesetzt ist, setzt man mit dem Durchsaugen von Luft ein. Den Luftstrom regelt man so, daß pro Sekunde 2—3 Bläschen durch das Barytwasser streichen. Dann beginnt man mit der äußerst vorsichtigen Zuführung der H_2SO_4, indem man den Stöpsel *f* sehr wenig und langsam lüftet, so daß nur einige Tropfen H_2SO_4 durch die Röhre *c* in den Kolben fließen. Die Reaktion ist, besonders wenn kohlenhydrathaltige Substanzen verbrannt werden, eine sehr heftige, die Gasentwicklung besonders anfangs eine sehr stürmische, so daß man die H_2SO_4 nur in sehr kleinen Portionen und langsam zufließen lassen kann. Man bringt so allmählich die ganze, zu einer Verbrennung nötige H_2SO_4 (130—140 *cm*³) in den Kolben.

Sobald die ganze H_2SO_4 im Kolben ist und die Gasentwicklung aufgehört hat, beginnt man mit dem vorsichtigen Erhitzen des Kolbens, das man so lange erhöht, bis der Kolbeninhalt in lebhaftes Sieden gerät, und erhitzt so lange, bis die Zersetzung vollkommen beendet ist. Das erkennt man daran, daß die Gasentwicklung — feine Bläschenbildung — aufhört

und der Kolbeninhalt eine dunkelgrüne Färbung annimmt, was nach 2- bis $2^1/_2$stündigem Sieden immer eintritt.

Nach Abstellen der Flamme wird noch $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang Luft durchgesaugt, um alle CO_2 in die Barytröhren zu schaffen.

Während der ganzen Zeit muß das CuO in der Verbrennungsröhre in Rotglut erhalten und sorgfältig darauf geachtet werden, daß die Temperatur der PbO_2 nicht über 180—200° C steigt. So werden einerseits die flüchtigen unvollständigen Oxydationsprodukte in der CuO-Schichte vollständig verbrannt und andrerseits die flüchtigen S- und Cl-haltigen Verbindungen im PbO_2 sicher zurückgehalten. Wird das PbO_2 stärker erhitzt, so gehen sehr leicht Halogenverbindungen in das Barytwasser über und machen die C-Bestimmung unbrauchbar.

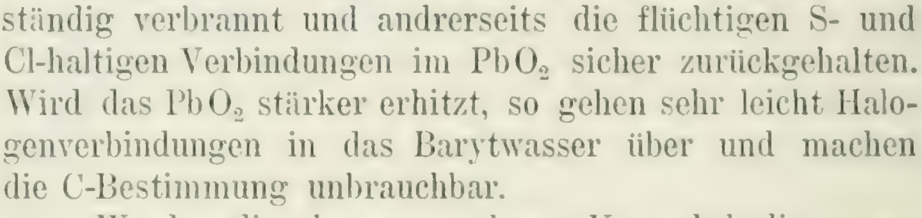


Fig. 92.

Werden die oben angegebenen Versuchsbedingungen genau eingehalten, so kann man selbst bei viel N-, Cl- und S-haltigen Substanzen im Barytwasser weder Nitrat-, noch Sulfat-, noch Cl-Ionen nachweisen.

Das Titrieren des Barytwassers erfolgt dann in der bekannten Weise. Gewöhnlich wird eine 0·06—0·09 n-$Ba[OH]_2$-Lösung benutzt, die mit 0·05 n-HCl und Phenolphtalein als Indikator titriert wird.

Hat man einen Doppelverbrennungsofen, so kann man, wie schon erwähnt, 2 Verbrennungen zu gleicher Zeit in ca. 3 Stunden ausführen.

* * *

Als Ergänzung zu Band I, S. 360, sei hier der von *Spiro* bei den nassen Kohlenstoffbestimmungen empfohlene Aufschlußkolben noch einmal abgebildet[1]), da die Fig. Nr. 491 mit einem Fehler behaftet ist (Fig. 92).

Ammoniak (vgl. Band III, S. 765).

Die verschiedenen Methoden der Ammoniakbestimmung beruhen entweder auf der Austreibung des Ammoniaks im Vakuum oder durch einen Luftstrom (*Folin*, vgl. S. 765). Nach dem ersten Prinzip arbeiten *V. Henriques* und *S. P. L. Sörensen*[2]) folgendermaßen: Der Apparat ist nach demselben Prinzip wie der von *Krüger* und *Reich* konstruiert, nur ist der Destillationskolben mit einem Scheidetrichter versehen

[1]) Nach *Neubauer-Huppert*, Analyse des Harns. 11. Aufl. S. 514.

[2]) *V. Henriques* und *S. P. L. Sörensen*, Über die quantitative Bestimmung der Aminosäuren etc. durch Formoltitration. 2. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **64**. 136 (1910). — An dieser Stelle sei erwähnt, daß *E. A. Slagle* neuerdings zur Aufbewahrung großer Mengen Harn für die quantitative Analyse empfiehlt, zu je 1 *l* Harn 5 *cm*³ konzentrierter H_2SO_4 zuzufügen und einzudampfen. Man erhält so einen festen, pulverisierbaren, in Wasser leicht löslichen Rückstand. Journ. of Biol. Chem. 8. 77 (1910).

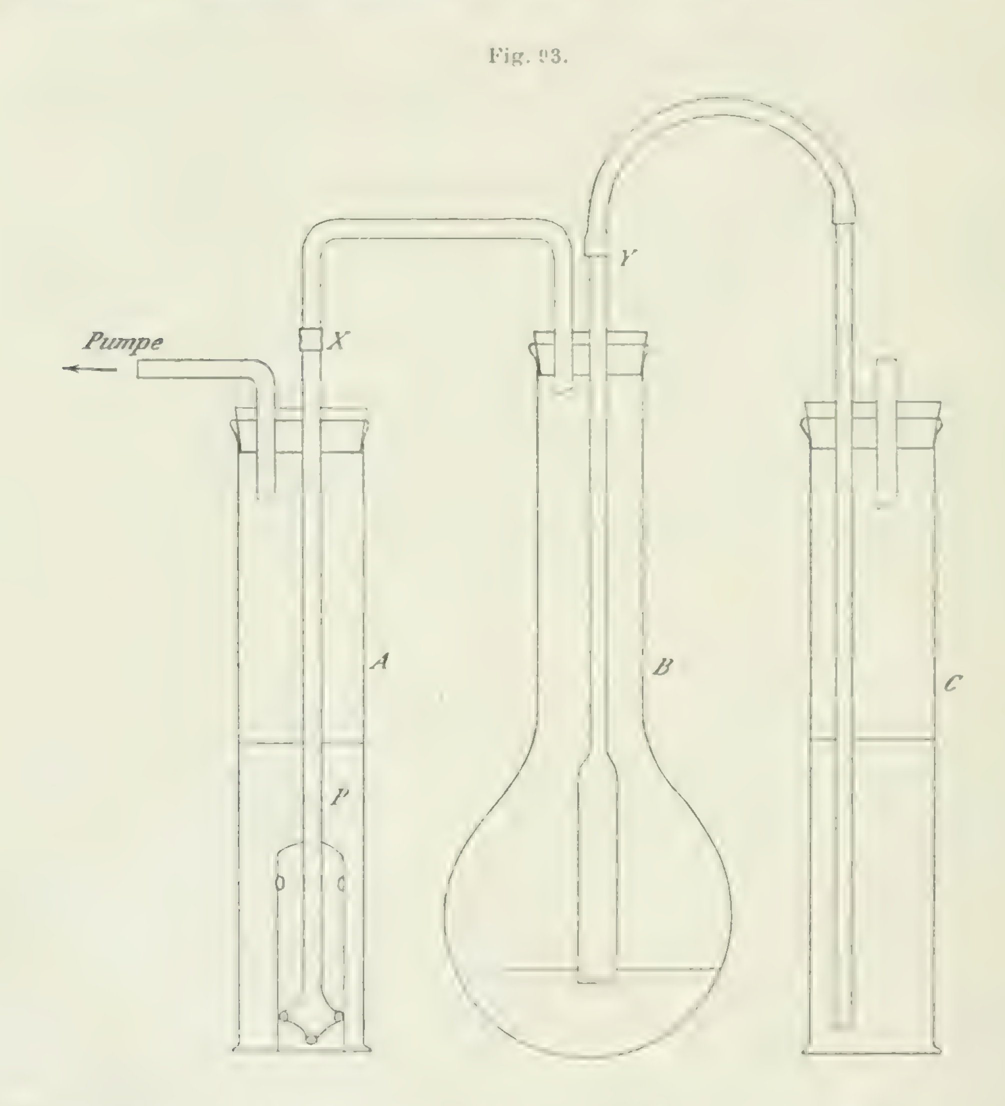
und als Kühlapparat dient ein verzinnter Metallkühler, der über dem ersten Schenkel der als Vorlage dienenden *Péligot*schen Röhre angebracht ist. Die Vorlage, die während der Destillation nicht gekühlt wird, wird mit ca. normaler Schwefelsäure beschickt und der auf dem zweiten Schenkel der *Péligot*schen Röhre angebrachte Destillieraufsatz wird mit der gleichen Säure gespült. Nachdem die zu destillierende Lösung in den Kolben gebracht worden ist, wird durch den Scheidetrichter eine ca. halbnormale Lösung von Bariumhydroxyd in Methylalkohol zugesetzt (bei sehr ammoniakreicher Lösung eine gesättigte Lösung von Bariumhydroxyd in Methylalkohol), und zwar so viel, daß nach der Abdestillation des Ammoniaks die Flüssigkeit noch einen deutlichen Überschuß an Bariumhydroxyd enthält (mindestens 10 cm^3). Während der Destillation bei ca 15 *mm* Druck wird der Kolben in Wasser von 40° erwärmt und ein schwacher Strom von kohlensäurefreier Luft wird durch den Kolben geleitet. Eine einmalige Destillation genügt, wenn der Kolbeninhalt in lebhaftem Sieden gehalten und fast bis zur Trockene abdestilliert wird. Bei größeren Ammoniakmengen (z. B. in mit Salzsäure gekochtem Harn) ist es notwendig, den Destillationsrückstand in ein wenig Salzsäure zu lösen und nach Zusatz vom Überschuß an methylalkoholischer Barytlösung noch einmal beinahe bis zur Trockene zu destillieren. Sollte das abgetriebene Ammoniak quantitativ bestimmt werden, so wurde das Destillat quantitativ in einen Kupferkolben für Kjeldahldestillation gespült, das Ammoniak in üblicher Weise abdestilliert und jodometrisch bestimmt (vgl. hierzu S. 297).

Die Austreibung des Ammoniaks mittelst Luftstroms nach dem Prinzip von *Folin* benutzt *Ph. A. Kober* [1]); die Methode kann auch beim Kjeldahlprozeß angewendet werden. Nach dem Säureaufschluß in üblicher Weise verdünnt man die erkaltete Masse mit Wasser, und zwar mit 95 cm^3 bei Anwendung von 25 cm^3 konzentrierter H_2SO_4, mit 40 cm^3 bei einer von 10 cm^3. Dann läßt man auf Zimmertemperatur abkühlen und stellt den Apparat zusammen. Die eingestellte Säure befindet sich in dem mit einem *Folin*schen Rohr versehenen Zylinder *A* (Fig. 93), die zu untersuchende Lösung im Kolben *B* und in *C* so viel Natronlauge, die genügt, die Lösung in *B* deutlich alkalisch zu machen. Das Rohr *T* soll nicht mehr als 1 *cm* tief in die Lösung tauchen. Man saugt mit einer Schnelligkeit, daß ca. 1—2 Minuten erforderlich sind, um alles Alkali zu überführen. Durch Einschaltung einer Klemmschraube bei *X* kann der Luftstrom schon vor dem Zufügen des Alkalis reguliert werden (auf ca. 100 Blasen pro Minute). Während des Zutritts des Alkali muß der Kolben *B* geschwenkt werden, damit Säure und Alkali sich ordentlich mischen. Dann entfernt man *C*, verbindet mit einem ammoniakfreie Luft liefernden Apparat und läßt die Luft in einem Tempo durchtreten, daß in *A* keine Säure durch Schäumen verloren geht. Es empfiehlt sich, möglichst karbonatfreie (am besten elektrolytisch dar-

[1]) *Ph. A. Kober*, Ein neuer Apparat zur quantitativen Verflüchtigung des Ammoniaks. J. Amer. Chem. Soc. **30**. 1131 (1908).

gestellte) Natronlauge zu verwenden. Das Übertreiben kann in einer Stunde beendet werden. Auch bei Anwesenheit von $MgHPO_4$ wird kein Ammoniak zurückgehalten, wenn man nur genügend überschüssiges Alkali (ca. 40% mehr als zum Neutralisieren der Säure erforderlich ist) anwendet.[1] Bei der *Folin*schen Ammoniakbestimmung kann der beschriebene Saugapparat verwendet werden, wenn an Stelle des hohen Zylinders ein Kjeldahlkolben genommen wird und statt 1 *g* trockenem K_2CO_3 5—10 *cm*³ gesättigte K_2CO_3-Lösung mit einer Pipette bei *Y* eingeführt wird.

Fig. 93.



Einen Ammoniakdestillierapparat mit Laugenzuführung, der sich besonders zu Massenuntersuchungen eignet, beschreibt *Rud. Michel.*[2])

Bei der Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Blut ver-

[1]) Vgl. hierzu *Ph. A. Kober*, Die quantitative Destillation des Ammoniaks mittelst Durchlüftung. J. Amer. Chem. Soc. **32**. 689 (1910) und *Gill* und *Grindley*, Stickstoffdestillation nach der *Kober*schen Methode. Ebenda. **31**. 1249 (1910). Vgl. auch *J. Sebelien*, Chem. Ztg. 1909. Nr. 87. *Davis*, J. Amer. Chem. Soc. **31**. 56 (1909). Über NH_3-Bestimmung bei Anwesenheit von viel Trippelphosphat vgl. *Folin*, Journ. biol. chem. 8. 497 (1910).

[2]) *Rud. Michel*, Anordnung eines Ammoniakdestillierapparates mit Laugenzuführung. Chem. Ztg. **34**. 620 (1910).

fahren *C. G. Wolf* und *Mc Kim Marriot* wie folgt[1]): Das geschlagene und durch Glaswolle, dann durch ein Leintuch filtrierte Blut (100 *cm*³) wird mit 50 *cm*³ gesättigter Kochsalzlösung versetzt, unter dauerndem Rühren werden 250 *cm*³ Methylalkohol zugefügt: man filtriert und bestimmt in 100 *cm*³ das Ammoniak nach Zusatz von 10 *cm*³ 2 n-Sodalösung indem man es im Vakuum (vor dem Evakuieren werden einige Bimsteinstücke zugesetzt) in zwei *Drechsel*sche Flaschen mit je 25 *cm*³ $\frac{1}{50}$ n-H_2SO_4 überdestilliert, was bei 40—50° 40 Minuten in Anspruch nimmt. Der Inhalt beider Vorlagen wird vereint, zur Austreibung der Kohlensäure einige Minuten im Sieden erhalten und mit Natronlauge mit alizarinsulfosaurem Natrium als Indikator titriert. Im Rückstand wird der Harnstoff nach *Folin* bestimmt.

Schwefel (vgl. Band III, S. 794 und dieser Band, S. 288).

Bei schwerer oxydierbaren biologischen Produkten schlagen *C. G. L. Wolf* und *E. Österberg*[2]) in Anlehnung an die von *Benedict* angegebene Methode folgendes Verfahren vor: Man bringt die zu analysierende Substanz in einen birnenförmigen, 300 *cm*³ fassenden Kolben mit einem langen Hals. Dazu fügt man 20 *cm*³ rauchende Salpetersäure, erhitzt zuerst auf einer kleinen Flamme und läßt dann schließlich so lange sieden, bis die Flüssigkeit frei von festen Bestandteilen ist. Das Kochen wird so lange fortgesetzt, bis keine Salpetrigsäuredämpfe mehr aufsteigen. Die so zersetzte Substanz wird dann quantitativ mit destilliertem Wasser in eine 150 *cm*³ große Porzellanschale oder -Tiegel mit abnehmbarem Deckel übertragen und 20 *cm*³ *Benedict*sche Lösung (kristallisiertes Kupfernitrat 200 *g*, Natrium- oder Kaliumchlorat 50 *g*, destilliertes Wasser 1000 *cm*³) hinzugefügt. Man läßt die Mischung in einem Sandbade verdampfen, bis sie ganz trocken ist. Darauf wird die Schale auf freier Flamme erhitzt und die Hitze allmählich gesteigert, bis der Boden des Gefäßes rotglühend ist. Auf dieser Temperatur wird sie 20 Minuten gehalten. Dann läßt man die Schale abkühlen, fügt 25 *cm*³ Salzsäure (1 : 4) hinzu und erwärmt den Inhalt der Schale, bis der ganze schwarze Bodensatz in derselben aufgelöst ist. Die Lösung wird dann in einen 500 *cm*³ großen Erlenmeyerkolben übertragen, ungefähr 150 *cm*³ Wasser zugefügt und die Lösung 15 Minuten lang gekocht. Dann läßt man sie abkühlen und ein paar Stunden stehen, am besten über Nacht. Zum Schluß filtriert man sie durch einen kleinen Trichter. Alsdann wird Bariumchlorid tropfenweise so lange zugesetzt, bis

[1]) *C. G. Wolf* und *Mc Kim Marriot*, Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff im Blut. Biochem. Zeitschr. **26**. 165 (1910).

[2]) *C. G. L. Wolf* und *Emil Österberg*, Die quantitative Bestimmung von Schwefel und Phosphor. Biochem. Z. **29**. 429 (1910). Zur Schwefelbestimmung vgl. noch: *Stanley Ritson*, A Comparison of the methods for the elimination of total sulphur in urine. The biochem. Journ. **4**. 337 (1909) und The use of barium peroxyd in the elimination of total sulphur in urine. Ebenda. **4**. 343 (1909); *St. R. Benedict*, The determination of total sulphur in urine. Journ. of biol. Chem. **8**. 499 (1910).

kein Niederschlag mehr entsteht, einige Stunden stehen gelassen und durch einen Goochtiegel filtriert. Das schwefelsaure Barium wird mit heißem Wasser gewaschen, bis die Spülflüssigkeit bariumfrei ist. Dann wird geglüht und gewogen. Das Schäumen fetthaltiger Substanzen verhindert man durch Hinzufügen von 5 *cm*³ 5 n-Salpetersäure, wenn die Lösung zur Trockenheit verdampft ist.

Als Nachtrag zur Bestimmung der Sulfatschwefelsäure (Band III, S. 797) sei noch die von *R. v. Lengyel* vorgeschlagene Fällung mittelst alkoholischer Strontiumchloridlösung erwähnt.[1]) 25 *cm*³ des vorher filtrierten Harnes werden auf das dreifache verdünnt, mit 5 *cm*³ verdünnter Salzsäure angesäuert, bis nahe zum Sieden erhitzt und mit 50 *cm*³ Strontiumchloridlösung (gesättigte Lösung von $SrCl_2$ in 99⁰/₀igem Alkohol; 100 *g* der Lösung enthalten 0·817 *g* wasserfreies $SrCl_2$) tropfenweise gefällt. Dann werden noch 150 *cm*³ 95⁰/₀iger Alkohol zugefügt, der Flüssigkeitsstand markiert, einige Stunden mit aufgelegtem Uhrglas auf dem Wasserbade stehen gelassen, dann noch warm bis zur Marke aufgefüllt und in der Kälte stehen gelassen, bis der Niederschlag sich absetzt. Nach dem vollständigen Erkalten wird die überstehende Lösung durch ein Filter gegossen, der Niederschlag dreimal dekantiert, mit Alkohol auf ein Filter gespritzt und mit wässerigem Alkohol bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen. Man äschert das Filter mit dem Niederschlag ein, glüht das $SrSO_4$ einigemal unter Zufügen von einigen Tropfen verdünnter H_2SO_4 schwach.

Ist eine Reinigung des Bariumsulfatniederschlages nötig (vgl. Band III, S. 798), so verfährt man nach *Brügelmann*[2]) so, daß man den Niederschlag im Platintiegel mit 3—4 Tropfen konzentrierter HCl und mit einigen Kubikzentimetern Wasser versetzt, die Klümpchen mit einem Glasstab zerteilt und die Flüssigkeit etwa 2 Minuten lang, ohne daß diese ins Sieden kommt, über der Flamme erwärmt. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird durch ein kleines Filter gegossen, das angegebene Verfahren fünfmal wiederholt. Nun erst wäscht man aus und prüft das Waschwasser mit H_2SO_4 auf lösliches Barytsalz. Ist das Filtrat ganz oder bis auf Spuren frei von Baryt, so sammelt man den Niederschlag auf dem Filter, trocknet ihn und schüttet in einen gewogenen Platintiegel. Dieses Filter, wie auch das erste, auf dem der Barytniederschlag gesammelt wurde, verbrennt man in der Platinspirale und glüht nun die Asche mit dem Niederschlag im Tiegel. Man befeuchtet den Niederschlag mit verdünnter Schwefelsäure, verdunstet die Flüssigkeit vorsichtig, glüht den Tiegel wieder und wägt dann.[3]) Nach *M. J. Van't Kruijs*[4]) kann man statt konzen-

[1]) *R. v. Lengyel, Pflügers* Archiv. **104**. 514 (1904).

[2]) *G. Brügelmann*, Zeitschr. f. analyt. Chemie. **16**. 22.

[3]) In Bd. III, S. 798, 6. Zeile von oben ist der Satz: „Man dampft das in den Platintiegel etc." zu streichen.

[4]) *M. D. Van't Kruijs*, Die quantitative Bestimmung von $BaSO_4$ neben Substanzen, welche das Resultat beeinflussen. Zeitschr. f. analyt. Chemie. **49**. 393 (1910); vgl. auch Chem. Weekblad. **6**. 735 (1909).

trierter HCl auch eine Mischung von 3 Teilen HCl und 1 Teil HNO_3 anwenden; in diesem Falle genügt die halbe Stärke (10%).

Aminosäuren.

Über weitere Ausbildung der Formolmethode von *V. Henriques* und *S. P. L. Sörensen* ist bereits in dem Nachtrage zu Band III (S. 1347) berichtet worden.[1])

Bezüglich der Anwendung der Natron- oder Barytlauge wird von *Sörensen*[2]) darauf hingewiesen, daß es in karbonat- und phosphatfreien Lösungen gleichgültig ist, ob man bei der Formoltitration die eine oder die andere anwendet. Kohlensäure- und phosphorsäurehaltige Flüssigkeiten müssen vorher mit Bariumchlorid und Barytlauge behandelt werden, wodurch die Kohlensäure und die Phosphorsäure als Bariumsalze gefällt werden; in dem Filtrat kann dann die Neutralisation mit Lackmuspapier als Indikator und die darauffolgende Formoltitrierung bis zu stark roter Farbe mit Phenolphtalein ausgeführt werden. In karbonat- oder phosphathaltigen Lösungen ist Barytlauge der Natronlauge vorzuziehen. Nur in Fällen, wo Bariumverbindungen störende Niederschläge hervorrufen, ist es notwendig, bei der Titrierung NaOH zu verwenden. In solchen Fällen ist der Umschlag jedoch nicht so scharf.

Zur Bestimmung des Gehaltes der Proteinstoffe und ihrer Spaltprodukte an peptidgebundenem Stickstoff verfahren *V. Henriques* und *J. K. Gjaldbäk*[3]) wie folgt, wobei als Beispiel die von diesen Forschern an *Witte*-Pepton durchgeführte Untersuchung mitgeteilt werden soll. 25 *cm*³ Lösung eines zirka 4%igen *Witte*-Peptons (mit einem N-Gehalt von 57·25 *mg* in 5 *cm*³) werden in einem Meßkolben bis auf 200 *cm*³ verdünnt, nach vorheriger genauer Neutralisierung mit Lackmuspapier. Von dieser Lösung werden 40 *cm*³ zur Formoltitrierung genommen, andere 40 *cm*³ zur Ammoniakbestimmung. Die Formoltitrierung ergab 13·44 *mg* formoltitrierbaren Stickstoff, die NH_3-Bestimmung 0·80 *mg* N als NH_3. Mithin beträgt die Menge des Aminosäure-N 12·04 *mg*. — 25 *cm*³ der ursprünglichen Peptonlösung werden in eine Porzellanschale gebracht, 25 *cm*³ konzentrierter HCl hinzugefügt, die Flüssigkeit bis zur Trockene eingedampft, von neuem

---

[1]) Über die Formolmethode vgl. u. a. *O. v. Spindler*, Beiträge zur Harnanalyse. Schweizerische Wochenschr. f. Chem. u. Pharm. **47**. 767 (1910); *K. Björn-Andersen* und *Marius Lauritzen*, Über Säure- und Ammoniakbestandteile im Urin und ihre klinische Anwendung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **64**. 21 (1910); *H. Malfatti*, Zur Formoltitrierung der Aminosäuren im Harn. Ebenda. **66**. 152 (1910); *L. de Jager*, Über den Einfluß des Harnstoffs auf die Bestimmung des Aminosäurengehaltes nach der Formoltitrierungsmethode. Ebenda. **67**. 105 (1910).

[2]) *S. P. L. Sörensen*, Bemerkungen über die Formoltitrierung, insbesondere über die Anwendung von Natronlauge oder Barytlauge bei derselben. Biochem. Zeitschr. **25**. 1 (1910).

[3]) *V. Henriques* und *J. K. Gjaldbäk*, Über die quantitative Bestimmung der im Proteine oder in dessen Abbauprodukten vorhandenen Peptidbindungen. Deutsche physiol. Chemie. **67**. 8 (1910).

Salzsäure hinzugefügt und wieder bis zur Trockene eingedampft. Den Rest bringt man mit Hilfe von Wasser in einen 100 cm^3-Meßkolben. Die stark braun gefärbte Flüssigkeit entfärbt man durch Fällung mit $\frac{1}{3}$-n-$AgNO_3$ (20 cm^3 $\frac{1}{3}$-n-Silbernitratlösung und 4 cm^3 2 n $BaCl_2$-Lösung[1]) und verdünnt bis zur Marke (+ 0·2 cm^3 für das gefällte Silberchlorid). Von dem nun schwach gelblichen Filtrate führt man 50 cm^3 in einen 100 cm^3-Kolben über, man neutralisiert die Flüssigkeit genau mit Lackmuspapier und verdünnt bis zur Marke. Von dem Inhalt des Kolbens nimmt man 40 cm^3 (= 5 cm^3 der ursprünglichen Lösung) zur Formoltitrierung und 40 cm^3 zur Ammoniakbestimmung. Es wurden gefunden 36·80 *mg* formoltitrierbarer N und 4·05 *mg* NH_3-N, also 32·75 *mg* Aminosäuren-N. Wurde dieselbe Menge Peptonlösung 1 Stunde mit konzentrierter HCl gekocht und wie oben verfahren, so wurden gefunden 41·72 *mg* formoltitrierter N, 3·95 *mg* NH_3-N und 37·77 *mg* Aminosäuren-N; nach 12stündigem Kochen mit zirka 20%iger HCl war die Menge des Aminosäurestickstoffs 40·54 *mg*. Um den Spaltungsgrad auszudrücken, gibt man die Menge des noch ferner lösbaren peptidgebundenen N in Prozenten der vorhandenen Menge Aminosäurestickstoffs. In dem gegebenen Beispiel war die Gesamtmenge des Aminosäurestickstoffs 40·54 *mg*; durch zweimaliges Eindampfen auf dem Wasserbad mit HCl fand man 32·75 *mg* Aminosäuren-N, es waren mithin noch 7·79 *mg*, d. h. 19·2% peptidgebundenen Stickstoffs übrig. Der Fehler der Methode beträgt zirka 0·56 *mg* N.

Über die Bestimmung des Aminstickstoffs im Harn nach *van Slyke* vergl. die Mitteilung dieses Autors in der zweiten Hälfte dieses Bandes.

Harnstoff (vgl. Band III, S. 774).

In jüngster Zeit geben *V. Henriques* und *S. A. Gammeltoft*[2]) in einer Mitteilung, in der auch andere Harnstoffbestimmungsmethoden kritisch beleuchtet werden, folgendes Verfahren zur Bestimmung des Harnstoffes im Harn an. In 5 cm^3 Harn wird zuerst bestimmt, wieviel einer 10%igen Phosphorwolframsäurelösung (in ½ n-H_2SO_4) nötig ist, um gerade eine vollständige Fällung hervorzurufen. Sodann mißt man in einem 100 cm^3-Kolben 10 cm^3 Harn, setzt die vorher bestimmte Menge der Phosphorwolframsäurelösung hinzu und füllt den Kolben bis zur Marke mit ½ n-H_2SO_4. Die Flüssigkeit bleibt nun — nach Mischung — so lange stehen, bis der Bodensatz sich gerade gesetzt hat, und wird dann filtriert. Von dem Filtrate bringt man 2mal 10 cm^3 in Reagenzgläser aus Jenaglas, welche sodann — mit Zinnfolie bedeckt — 1½ Stunden bei 150° autoklaviert werden. Der Inhalt der Gläser wird nun in entsprechende Kolben gebracht

[1]) *V. Henriques* und *L. A. Gammeltoft*, Einige Bemerkungen über Harnstoffbestimmung im Harn. Skandin. Arch. f. Physiologie. **25**. 153 (1911).

[2]) Vgl. *S. P. L. Sörensen* und *H. Jessen Hansen*, Über die Ausführung der Formoltitrierung in stark farbigen Flüssigkeiten. Biochem. Zeitschr. **7**. 407 (1908).

und die Ammoniakmenge entweder durch Durchlüftung (nach Zusatz von kohlensaurem Natrium) oder durch Destillation im Vakuum (nach Zusatz von Bariumhydroxyd in Methylalkohol gelöst) bestimmt.

Kreatinin (vgl. Band III, S. 783).

Zur Darstellung des Kreatinins aus dem Harn geben *Folin* und *Blanck* neuerdings folgende Methode an[1]:

In ungefähr 8 *l* frischen Harns wird unter Rühren eine heiße alkoholische Lösung, die ungefähr 125 *g* Pikrinsäure enthält, zugefügt. Die Mischung bleibt über Nacht stehen, es wird dann die überstehende Flüssigkeit abgegossen, das Sediment auf der Nutsche mit verdünnter Pikrinsäure und kaltem Wasser gut ausgewaschen, dann in zirka 400 cm^3 lauwarmem Wasser suspendiert und zirka 60 *g* gepulvertes Kaliumbikarbonat hinzugefügt. Der Kolben wird in warmes Wasser von 55—60° getaucht und sorgfältig geschwenkt, bis die Entwicklung von CO_2 aufhört. Die Temperatur muß dabei auf 45—50° gehalten werden. Beim Einspritzen von Alkohol in den Kolben hört das Schäumen auf. Sobald sich keine Kohlensäure mehr entwickelt, wird der Kolben in kaltes Wasser gestellt und nach einigen Stunden die Reaktionsflüssigkeit filtriert und mit 50%iger Essigsäure bis zur bleibenden sauren Reaktion vorsichtig angesäuert. Wenn sich keine Kohlensäure mehr entwickelt, wird die Lösung durch einen Überschuß von alkoholischer Chlorzinklösung gefällt und so das Chlorzinkdoppelsalz erhalten. Die Fällung ist gewöhnlich in 1—2 Tagen beendet. Der Niederschlag wird auf einem Buchnerfilter gesammelt und gründlich gewaschen. Durch Lösung des Chlorzinkdoppelsalzes in 10%iger Schwefelsäure und Fällen der Lösung mit Azeton, Alkohol oder Äther erhält man ein neues Salz von der Formel: Kreatinin 2 SO_4, Zn SO_4, 8 H_2O, Kreatininzinkalaun, das als Ausgangsmaterial für die Darstellung reinen Kreatinins dienen kann. Es wird zunächst durch Umkristallisieren aus Wasser nach Behandlung mit Tierkohle gereinigt. Zu einer 10%igen Lösung des reinen Produktes in heißem Wasser wird die zur Bildung der Schwefelsäure berechnete Menge Bariumazetat in Lösung zugefügt und in die Mischung zur Fällung des Zinks Schwefelwasserstoff eingeleitet. Das Filtrat, das nur noch Kreatinin und Essigsäure enthält, wird bei 50° im Vakuum zur Trockene eingedampft, der Rückstand zur Entfernung des Restes Essigsäure mit wenig kaltem Alkohol gewaschen. Die Ausbeute an Kreatinin ist fast quantitativ.

Zur Überführung trockenen Kreatins in kristallisiertes Kreatinin[2]) wird das Kreatin in eine Flasche mit Glasstöpsel gebracht und zugestöpselt in ein gewöhnliches irdenes Gefäß gestellt, dessen Deckel fest verschlossen

---

[1]) *Folin* and *Blanck*, The preparation of creatinine from urine. Journ. biol. Chem. 8. 395 (1910).

[2]) *O. Folin* and *W. Denis*, The preparation of creatinine from creatine. Journ. biol. Chem. 8. 399 (1910).

ist. Dieses wird in Wasser im Autoklaven auf $4^1/_2$ Atmosphären drei Stunden lang erhitzt, dann abgekühlt. Zur Reinigung wird es mit kaltem Alkohol gewaschen oder mit sehr wenig absolutem Alkohol gekocht.

Ein neues billiges Kolorimeter, das außer zur Bestimmung von Blutfarbstoff, Eisen und Indikan auch zu der von Kreatinin nach der *Folin*schen Methode geeignet ist, geben *W. Authenrieth* und *J. Koenigsberger* an.[1])

An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, daß bei der Angabe der nötigen Reagenzien bei der *Folin*schen Methode in Band III, S. 787 zwei störende Druckfehler stehen geblieben sind. Es sollen daher die erforderlichen Reagenzien hier wieder aufgezählt werden:

1. Eine $\frac{1}{2}$-n-Kaliumbichromatlösung (24·54 *g* pro Liter).
2. Eine annähernd gesättigte (1·2$^0/_0$ige) Pikrinsäurelösung.
3. 10$^0/_0$ige Natronlauge.

* * *

Zur Isolierung des Kreatinins aus Suppenwürzen sowie aus geringen Mengen Fleischextrakt schlägt *Micko*[2]) folgendes Verfahren vor:

Eine wässerige Lösung von 10 *g* *Liebig*schem Fleischextrakt wird mit Bleiessig bei Zimmertemperatur ausgefällt, auf 1 *l* mit Wasser verdünnt, nach mehrstündigem Stehen filtriert, das Filtrat nach Zusatz von HCl auf dem Wasserbade eingedampft, vom Chlorblei abfiltriert, das eingeengte Filtrat mit mehrfachem Volumen heißen Alkohols vermischt, nach dem Abkühlen filtriert, das Filtrat ganz eingedampft, der Rückstand mit 80—100 cm^3 Wasser aufgenommen, die mit NaOH neutralisierte Flüssigkeit mit 10 cm^3 einer Lösung von 200 *g* pulverigem Natriumbisulfit in 1 *l* Wasser und mit ebensoviel einer Lösung von 130 cm^3 $CuSO_4$ in 1 *l* Wasser versetzt, aufgekocht, nach dem Abkühlen filtriert. Aus dem von Xanthinbasen befreiten Filtrat wird die schwefelige Säure durch Zusatz von HCl und Eindampfen auf dem Wasserbad vertrieben, dann das Kupfer mit H_2S gefällt. Das Filtrat wird eingedampft, mit heißem Alkohol ausgezogen, dieser Vorgang (zur Entfernung der Chloralkalien) wiederholt, bis die Salzrückstände keine oder nur geringe Reaktion nach *Jaffé* geben. Der erhaltene Sirup wird mit ca. 50 cm^3 verdünnter H_2SO_4 (1 : 3) und mit 30$^0/_0$iger Phosphorwolframsäurelösung gefällt, der Niederschlag nach zweitägigem Stehen gefällt, der Niederschlag mit stark verdünnter, mit H_2SO_4 angesäuerter Phosphorwolframsäurelösung gewaschen, dann abgesaugt, in heißem Wasser aufgeschwemmt, mit Barvumhydroxyd versetzt, bis zur alkalischen Reaktion. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit heißem Wasser ge-

[1]) *W. Authenrieth* und *J. Koenigsberger*, Über ein neues Kolorimeter und dessen Verwendung zur Bestimmung von Blutfarbstoff, Eisen, Indikan und Kreatinin. Münchener med. Wochenschr. **57**. 998 (1910).

[2]) *K. Micko*, Über Isolierung des Kreatinins aus Extrakten. Zeitschr. f. Unters. Nahrungs- u. Genußm. **19**. 426 (1910).

waschen, das Filtrat mit verdünnter H_2SO_4 neutralisiert, die neutrale Flüssigkeit bis zum Sirup eingedampft. Zur Überführung des unter der Einwirkung des Barymhydroxyds gebildeten Kreatins löst man den Sirup in etwa 10—15 *cm*³ $\frac{1}{2}$-n-H_2SO_4 und 50 *cm*³ Wasser auf, dampft ein, nimmt den Rückstand in 50 *cm*³ Wasser auf und dampft die Flüssigkeit nochmals ein. Der Sirup wird mit wenig Wasser in einen Kolben gebracht, die konzentrierte Lösung mit heißem Alkohol vermischt, bis zum nächsten Tag stehen gelassen, die klare Flüssigkeit vom ungelösten abgegossen, der Alkohol durch Destillation verjagt, wieder mit heißem Alkohol vermischt und wieder der Alkohol verjagt. Die in saurem Alkohol unlöslichen Anteile des Sirups werden zur Gewinnung der darin enthaltenen kleinen Mengen Kreatinin in sehr wenig Wasser gelöst, mit siedendem Alkohol vermengt und wie oben verfahren. Die alkoholischen Auszüge werden durch Destillation vom Alkohol befreit, der Rückstand wird in 25—30 *cm*³ Wasser aufgenommen, die zum Sieden erhitzte Lösung wird mit Bleihydroxyd versetzt bis zur alkalischen Reaktion und die Mischung mit dem mehrfachen Volumen absoluten Alkohols verdünnt. Die nach mehrstündigem Stehen filtrierte Flüssigkeit wird nach Abdestillieren des Alkohols mit H_2S behandelt, zum Sirup eingedampft, das Kreatinin ins Pikrat übergeführt, dies in das salzsaure Kreatinin übergeführt. Zu diesem Zwecke wird das Pikrat mit verdünnter HCl erwärmt, die freigewordene Pikrinsäure durch Schütteln der noch heißen Flüssigkeit mit Toluol beseitigt, die wässerige Lösung des salzsauren Kreatinins eingedampft. Die feuchte Kristallmasse wird mit einem Gemisch von $^1/_3$ Azeton und $^2/_3$ absolutem Alkohol gewaschen (Schm. 243—244°).

Phenole (vgl. Band III, S. 823).

C. Neuberg und *A. Hildesheimer*[1]) zeigen, daß die Angaben *Moosers* (vgl. Band III, S. 826) über die Brauchbarkeit der Phosphorsäure für die direkte jodometrische Phenol- bzw. Kresolbestimmung bei Herbivorenharnen unzutreffend sind. Für Pflanzenfresser und Diabetikerurinen ist die von *Neuberg* angegebene Modifikation des *Kossler-Penny*schen Verfahrens anzuwenden.

Eine Methode zur getrennten Bestimmung von Phenol und Parakresol im Harn geben *M. Siegfried* und *R. Zimmermann*[2]) an. Die Grundidee der Methode ist die folgende: Bei der ersten Bestimmung wird diejenige Menge Br (b_1) ermittelt, die das Phenol und das Kresol zusammen verbrauchen, indem aus ersterem Tribromphenol, aus letzterem Tribromkresol entsteht, bei einer zweiten diejenige Menge Br (b_2), die bei der Überführung des Phenols in Tribromphenol und des Kresols in Dibromkresol verbraucht wird.

[1]) *C. Neuberg* und *A. Hildesheimer*, Die Bestimmung der Phenole im Rinderharn. Biochem. Zeitschr. **28**. 525 (1910).

[2]) *M. Siegfried* und *R. Zimmermann*, Methode zur getrennten Bestimmung von Phenol und Parakresol im Harne. Biochem. Zeitschr. **29**. 368 (1910).

Die erforderlichen Reagenzien sind:

1. $\frac{1}{10}$-n-Natriumthiosulfatlösung.

2. Kaliumbromatbromidlösung, im Liter 0·834 *g* Kaliumbromat und 2·97 Kaliumbromid enthaltend.

3. 5%ige Jodkaliumlösung, die nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure Stärkelösung nicht bläuen darf.

4. Lösliche Stärke.

5. Schwefelsäure (1 : 1).

6. Ca. 25%ige Salzsäure.

Die Bestimmung von b_1 erfolgt wie folgt: In einer ca. 500 cm^3 fassenden, mit Glasstopfen versehenen enghalsigen Flasche versetzt man die genau gemessene Menge der wässerigen Lösung des Phenolgemisches (100 cm^3) mit 20—30 cm^3 Schwefelsäure (1 : 1), schüttelt um und fügt aus einer Bürette unter Umschwenken zunächst so viel Kaliumbromidbromatlösung dazu, bis sich beim Schütteln der Niederschlag zusammenballt und die Flüssigkeit deutlich gelb gefärbt ist. Dann läßt man noch den achten Teil der angewandten Menge Bromlauge hinzufließen und läßt die Mischung gut verschlossen unter öfterem kräftigem Schütteln 1 Stunde lang stehen. Hierauf wird unter Vermeidung von Bromverlust durch Glaswolle in 25 bis 30 cm^3 5%ige KJ-Lösung filtriert, die erste Flasche mit Wasser gut nachgespült, mit diesem zur Absorption freier Bromdämpfe gut durchgeschüttelt und mit diesem Wasser der Niederschlag ausgewaschen. Im Filtrat wird mit $\frac{1}{10}$-n-Thiosulfatlösung das Jod titriert. — Bei der Bestimmung von b_2 wird die gleiche Menge der Lösung des Phenolgemisches wie bei der ersten Bestimmung in einer mit Glasstopfen versehenen Literflasche mit ca. 30 cm^3 25%iger HCl versetzt und bis auf ca. 500 cm^3 Wasser verdünnt. Dann fügt man unter gleichmäßigem langsamen Umschwenken diejenige Menge Bromatbromidlösung hinzu, die nach der ersten Bestimmung bis zur Gelbfärbung der Flüssigkeit verbraucht wurde und läßt die Mischung ohne zu schütteln gut verschlossen 15 Minuten stehen. Nach dieser Zeit versetzt man die Mischung mit 25—30 cm^3 5%iger KJ-Lösung, schüttelt allmählich um, bis die Flüssigkeit gleichmäßig gefärbt ist und läßt die Mischung eine Stunde vor Licht geschützt stehen. Darauf schüttelt man mehrere Male kräftig durch und titriert das freie Jod mit $\frac{1}{10}$-n-Natriumthiosulfatlösung. Sind x und y die gesuchten Mengen Parakresol bzw. Phenol, so ist $x = 0·67605\,(b_1 — b_2)$ und $y = 0·5884\,b_2 — 0·3923\,b_1$. — Den Titer der Bromatbromidlösung bestimmt man in folgender Weise: In einer verschließbaren Flasche von ca. 250 cm^3 Inhalt werden 100 cm^3 Bromatbromidlösung mit 10 cm^3 25%iger HCl und mit 15 cm^3 5%iger KJ-Lösung vermischt. Das freie Jod wird mit $\frac{1}{10}$-n-Thiosulfatlösung titriert, wobei die Stärkelösung erst gegen Ende der Reaktion zugefügt wird. 1 cm^3 Thiosulfatlösung = 0·007992 Br.

Hippursäure (vgl. Band III, S. 829).

Eine von *Dakin*[1]) vorgeschlagene Darstellungsweise der Hippursäure ist die folgende:

Man dampft 300—500 *cm*³ Harn auf dem Wasserbade auf zirka 100 *cm*³ ein, säuert stark mit H_3PO_4 an und extrahiert ca. 12 Stunden lang mit Essigester im Extraktionsapparat. Der Essigester wird zur Entfernung des Harnstoffs viermal mit konzentrierter Kochsalzlösung ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen und mit Wasserdampf destilliert. Man kocht den wässerigen Rückstand mit Tierkohle, filtriert und läßt erkalten. Dabei kristallisiert ein großer Teil der Hippursäure aus. Das Filtrat von den Kristallen wird mit Benzol + Äther ausgeschüttelt, die wässerige Lösung zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit den vorher ausgeschiedenen Kristallen vereinigt.

Urobilin (vgl. Band III, S. 854).

Nachweis: Man mischt 20 *cm*³ Harn mit 4 *g* pulverisiertem Zinkazetat, gibt 20 *cm*³ 95%igen Alkohol hinzu, rührt einige Sekunden um, läßt absitzen und filtriert. Die Empfindlichkeit der Reaktion nimmt zu, wenn man mit dem Filtrieren 1—2 Stunden wartet. Besonders geeignete Zinksalze sind: Valerianat, Laktat, Azetat, weniger geeignet sind das basische Karbonat, Chlorid, Sulfat (*Weitz*[2]).

Als klinisches Reagens für Urobilinogen, Urobilin und Blut soll man nach *A. Florence*[3]) zu 2—3 *cm*³ Harn das Doppelte eines aus 50 *g* Pyridin, 50 *g* Chloroform, 50 *g* Alkohol und 7·5 *g* Zinkazetat hergestellten Reagenzes hinzufügen. Grüne Fluoreszenz zeigt Urobilin an, eine allmähliche Fluoreszenz Urobilinogen, grünliche Färbung mit nachfolgender Fluoreszenz Biliverdin, Rotfärbung Blut.

Eine Methode, um Urobilinogen in kleinen Mengen Serum nachzuweisen, beschreibt *W. Hildebrandt*[4]). Auf weißer Porzellanschale wird zu einem Tropfen Serum (vorteilhaft auf Chloroform schwimmend) ein Tropfen des *Ehrlich*schen p-Dimethylaminobenzaldehydreagens hinzugefügt; ein zweiter Tropfen Serum ohne jeden Zusatz von Reagens dient zur Kontrolle. Die bei gewöhnlicher Temperatur auftretende Rotfärbung ist auch bei mäßigem Urobilingehalte des Serums deutlich.

Inosit (vgl. Band III, S. 828).

Die *Scherer*sche Reaktion auf Inosit ist von *E. Salkowski*[5]) folgendermaßen verbessert worden: Man löst eine Spur der für Inosit gehaltenen

[1]) *H. D. Dakin*, Das Schicksal von Natriumbenzoat im menschlichen Organismus. Journ. of biol. Chem. 7. 103 (1910).

[2]) *Weitz*, Journ. Pharm. Chem. (7). **1**. 533 (1910); vgl. Chem. Zentralbl. II. 501 (1910).

[3]) *Florence*, Journ. Pharm. Chim. (7). **2**. 160 (1909).

[4]) *W. Hildebrandt*, Über Urobilin im Blute. Münchener med. Wochenschr. **57**. 2574 (1910).

[5]) *Salkowski*, Über eine Verbesserung der *Scherer*schen Reaktion auf Inosit. Zeitschr. f. physiol. Chem. **69**. 478 (1910).

Substanz in 1—2 Tropfen Salpetersäure (Dichte 1·2), setzt 1 Tropfen 10%ige Chlorkalziumlösung, 1 Tropfen 1—2%iger Platinchloridlösung hinzu, verdampft vorsichtig unter Aufblasen und Umschwenken auf einem Porzellantiegeldeckel. Bei Gegenwart von Inosit tritt rosarote bis ziegelrote Färbung ein.

Indol (vgl. Band III, S. 837).

Da Jod bei Anstellung der *Jaffé*schen Indikanreaktion Skatol vortäuschen und mäßige Mengen Indikan verdecken kann, soll man nach *B. Spiethoff*[1]) nach dem Ausschütteln mit Chloroform den Inhalt des Reagensglases filtrieren. Ist Skatol neben Jod vorhanden, so verschwindet beim Trocknen des Filters die blaue Jodstärkefärbung, die zunächst den ganzen Filter einnimmt: der rote Skatolniederschlag verbleibt hingegen am Boden des Filters.

Bezüglich der Skatolreaktion von *Takaoki Sasaki*[2]) (vgl. Bd. III, S. 1348) gibt *Sasaki* ergänzend an, daß die bei der Reaktion anzuwendende konzentrierte H_2SO_4 eine Spur Ferrisalz (in 100 *g* konzentrierter H_2SO_4 ca. 0·0002 *g* Fe als Ferrisalz) enthält. Am besten verfährt man so, daß man einen Tropfen 1%iger wässeriger Ferrisulfatlösung zu 100 *g* eisenfreier konzentrierter H_2SO_4 zusetzt.

---

[1]) *B. Spiethoff*, Eine einfache Methode zur Differenzierung von Jod, Indikan, Skatol bei der *Jaffé*schen Indikanreaktion. Münchener med. Wochenschr. **57**. 1066 (1910).

[2]) *Takaoki Sasaki*, Über eine empfindliche Skatolreaktion. Biochem. Zeitschr. **29**. 395 (1910).

Bestimmung der Reaktion mittelst Indikatoren.

Von **P. Rona**, Berlin.

Bei der Messung der wahren Reaktion einer Flüssigkeit kommt neben der elektrometrischen Methode die mittelst Indikatoren, das „kolorimetrische Verfahren", in Betracht. Wie es in Band I, S. 560 auseinandergesetzt ist, beruht die Methode auf dem Prinzip, daß das Umschlagsgebiet der verschiedenen Indikatoren bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration liegt; aus der Beobachtung der Farbennuance der mit dem Indikator versetzten Flüssigkeit kann man daher direkt auf die Wasserstoffionenkonzentration schließen. Die Farbennuancen beziehungsweise Umschlagspunkte einiger wichtiger Indikatoren gibt die folgende Tabelle I, die aus Band I übernommen ist, an.

Umschlagspunkte der gebräuchlichsten Indikatoren in dem für den Physiologen wichtigen Gebiet um den Neutralitätspunkt herum zeigt die Tabelle II.

Um die genaue Ausarbeitung der Indikatorenmethode hat sich *S. P. L. Sörensen* die größten Verdienste erworben.[1] Wir benutzen bei der Beschreibung dieses Verfahrens möglichst getreu die Ausführungen dieses Forschers. Zuerst prüfe man die zu untersuchende Flüssigkeit Lackmuspapier gegenüber; ist sie alkalisch, prüft man ihr Verhalten weiter gegen Phenolphtalein, ist sie sauer, gegen Methylorange. Nun kann der Bereich, innerhalb dessen die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung zu suchen ist, weiter eingeengt werden. Ist z. B. die Lösung gegen Lackmus sauer, gegen Methylorange alkalisch, so nimmt man einen Indikator, dessen Umschlagspunkt zwischen dem des Lackmus und dem des Methylorange liegt, z. B. das p-Nitrophenol. Nun mißt man in möglichst gleich großen, farblosen Probiergläsern folgende Phosphatgemische ab:

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	in Kubikzentimetern							
Primäres Phosphat . .	10	9·75	9·5	9·0	8·0	7·0	6·0	5·0
sekundäres Phosphat .	0	0·25	0·5	1·0	2·0	3·0	4·0	5·0

[1]) *S. P. L. Sörensen*, Enzymstudien. Biochem. Zeitschr. 21. 201 (1909).

Tabelle

Indikator	2 n H·	1 n H·	1·10⁻¹ nH·	1·10⁻² nH·	1·10⁻³ nH·	1·10⁻⁴ nH·	1·10⁻⁵ nH·	1·10⁻⁶ nH·
Mauvein	gelb	grün	grün-blau	blau	violett	—	—	—
Kongorot	blau	—	—	—	blau	violett	schar-lach	
Alizarinsulfo-saures Natrium	gelb-grün	—	—	—	—	—	braun	rot
Rosolsäure	gelb	—	—	—	hell-bräun-lich	—	—	hell-bräun-lich
Phenolphtalein	farblos	—	—	—	—	—	—	—
α-Naphtolben-zein	bräun-lich-gelb	—	—	—	—	—	—	—
Tropäolin 0	gelb	—	—	—	—	—	grün-gelb	—
Trinitrobenzol	farblos	—	—	—	—	—	—	—
Benzopurpurin	blau	blau-violett	violett	—	rot-violett	rosa	gelb, Stich rot	—
Safranin	blau	lila	rosen-rot	—	—	—	—	—

Tabelle

Indikator	$10^{-3\cdot7}_{nH\cdot}$	$10^{-4\cdot4}_{nH\cdot}$	$10^{-5\cdot4}_{nH\cdot}$	$10^{-6\cdot2}_{nH\cdot}$	$10^{-6\cdot5}_{nH\cdot}$
Methylorange	rotgelb	gelb	(maximal) gelb	(maximal) gelb	—
Alizarinrot	gelb	gelb	orangerosa	rot	rot
Rosolsäure	—	blaßgelb	blaßgelb	blaßgelb	gelb, Stich rosa
Lackmus	—	—	rot	rot	rotviolett
Neutralrot	—	—	—	—	—
Phenolphtalein	—	—	—	—	—

I.

$1 \cdot 10^{-7}$ nH·	$1 \cdot 10^{-8}$ nH·	$1 \cdot 10^{-9}$ nH·	$1 \cdot 10^{-10}$ nH·	$1 \cdot 10^{-11}$ nH·	$1 \cdot 10^{-12}$ nH·	$1 \cdot 10^{-13}$ nH·	$1 \cdot 10^{-14}$ nH·	$1 \cdot 10^{-15}$ nH·
—	—	—	—	—	—	—	violett-rot	gelb-rot
—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	lila	violett	—	—	—
rosa	rot	—	—	—	—	—	rot, langsam heller	rot, schnell farblos
—	farblos	rosa	rot	—	—	—	rot, schnell farblos	rot einfallend, gleich darauf farblos
—	—	—	grün	grün-blau	—	—	—	—
—	—	—	—	grün-gelb	orange	rot-orange	—	—
—	—	—	—	—	farblos	orange	rot-orange	fast farblos
—	—	—	—	—	—	gelb, Stich-rot	rosa	—
—	—	—	—	—	—	—	rosen-rot	violett

II.

$10^{-6 \cdot 8}$ nH·	$10^{-7 \cdot 1}$ nH·	$10^{-7 \cdot 4}$ nH·	$10^{-7 \cdot 7}$ nH·	10^{-8} nH·	$10^{-8 \cdot 3}$ nH·	$10^{-9 \cdot 2}$ nH·
—	—	—	—	—	—	—
rot	—	—	—	—	—	—
röter	maxim. rot	maxim. rot	—	—	—	—
rotviolett	violett	violett	blau-violett	blau-violett	—	fast reinblau
maxim. rot	rot, Stich orange	orange-rot	orange	orange-gelb	gelber	maxim. gelb
—	—	farblos	farblos	farblos,	rosa	rot (nicht maximal)

Das sind Gemische, die dem Konzentrationsbereiche der Wasserstoffionen entsprechen, das p-Nitrophenol umfaßt. In I ($P_H = 4·53$) ist p-Nitrophenol so gut wie farblos[1], in VIII ($P_H = 6·81$) grünlichgelb zwischen diesen zwei Grenzpunkten lassen sich die übrigen Gemische nach den Wasserstoffionenkonzentrationen scharf einreihen. Von der zu untersuchenden Lösung werden nun auch 10 cm^3 in ein entsprechendes Reagenzglas abgemessen, in jedes Glas eine passende Menge der Indikatorlösung eingetröpfelt, wonach die Farbe der Lösungen nach gutem, aber vorsichtigem Umschütteln verglichen wird. *Sörensen* empfiehlt Reagenzglasgestelle zu verwenden, deren am zweckmäßigsten 35 bis 40° gegen den horizontalen geneigten Boden mit einem Blatt reines Papier bedeckt ist und die so eingerichtet ist, daß eine Drehung des Gestelles von 35 bis 40° um dessen Längsachse es ermöglicht, quer durch die gesamten vorliegenden Reagenzgläser gegen das weiße Papier als Hintergrund unbehindert zu sehen.

Sollten die Anzahl Tropfen des angewendeten Indikators nicht genügen, eine deutliche Färbung hervorzurufen, so muß man zu allen Reagenzgläsern noch mehr Indikatorlösung (3, 6 bis 12 Tropfen je nach Bedarf) zufügen. Durch Einschaltung neuer Vergleichsmischungen kann die Methode noch verschärft werden.

Äußerst ausführliche und genaue Untersuchungen über die Fehlerquellen der kolorimetrischen Methode der Reaktionsbestimmung verdanken wir *S. P. L. Sörensen*. Auf Grund seiner Untersuchungen müssen dabei folgende Punkte berücksichtigt werden:

1. Eigenfarbe der Versuchsflüssigkeit. Falls die zu untersuchende Lösung nicht farblos ist, ist es vorteilhaft, um die Unterschiede des Farbentons zu verdecken, die Vergleichsflüssigkeiten mit verdünnten Lösungen passender Farbstoffe bis zum gleichen Farbentone zu versetzen. Die Färbungsmittel müssen natürlich denselben Farbenton geben innerhalb des ganzen in Frage kommenden Bereichs der Wasserstoffionenkonzentrationen. Als angemessene Färbungsmittel der Vergleichsflüssigkeiten bei der Messung solcher Lösungen, die bei den enzymatischen Spaltungen in Frage kommen, schlägt *Sörensen* folgende vor:

a) Bismarckbraun (0·2 *g* in 1 *l* Wasser),
b) Helianthin II (0·1 *g* in 800 cm^3 93%igem Alkohol + 200 cm^3 Wasser),
c) Tropäolin 0 (0·2 *g* in 1 *l* Wasser),
d) Tropäolin 00 (0·2 *g* in 1 *l* Wasser),
e) Curcumein (0·2 *g* in 600 cm^3 93%igem Alkohol + 400 cm^3 Wasser),
f) Methylviolett (0·02 *g* in 1 *l* Wasser),
g) Baumwollblau (0·1 *g* in 1 *l* Wasser).

[1]) Wird der Normalitätsfaktor einer Lösung in bezug auf Wasserstoffionen durch die Größe 10^{-p} angegeben, so schlägt *Sörensen* für den numerischen Wert des Potenzexponenten den Namen Wasserstoffionenexponent und die Schreibweise P_H vor. Unter dem Wasserstoffionenexponenten einer Lösung wird demnach der *Brigg*sche Logarithmus des reziproken Wertes des auf Wasserstoffionen bezogenen Normalitätsfaktors der Lösung verstanden.

Um der Vergleichsflüssigkeit gegebenen Falls eine passende Trübung zu verleihen (ohne wesentliche Änderung der Ionenkonzentration), kann eine wässerige Aufschwemmung von frisch gefälltem Bariumsulfat zugegeben werden. Die Anschwemmung wird bereitet durch Vermischen von 2 cm^3 einer 0·1 n-Bariumchloridlösung und 2 cm^3 einer 0·1 n-Kaliumsulfatlösung.

2. Einfluß der Neutralsalze. Der Umschlagspunkt der Indikatoren wird in verschiedenem Maße durch die Gegenwart der Neutralsalze beeinflußt. *L. Michaelis* und *P. Rona* [1]) wiesen eindringlich auf diese Fehlerquelle hin. So ist z. B. Methylviolett in einer 0·1 n-HCl-Lösung mit 0·005 n-KBr rein blau, in einer 0·1 n-HCl-Lösung mit 0·5 n-KBr rein grün. Beim Kongorot hingegen hat es den Anschein, als sei die H-Ionenkonzentration durch Zusatz eines Neutralsalzes zurückgegangen. Eine große Reihe von Indikatoren wird durch die Neutralsalze beeinflußt [2]); was die meisten Indikatoren anlangt, wird jedoch die Neutralsalzwirkung bei Salzkonzentrationen von 0·3 bis 0·5 n (d. h. 2—3mal der Salzgehalt des Blutes) zwar merkbar, ist aber nicht so groß, daß die Messungsergebnisse unbrauchbar wären. Nur beim Methylviolett und der zu dieser Gruppe gehörenden Indikatoren (Mauvein, Gentianaviolett, Methylgrün) ist die Salzwirkung eine solche, daß man gezwungen ist, sie immer zu berücksichtigen (*Sörensen*). [3]) Um ein Beispiel über das Ausmaß der durch die Neutralsalze bedingten Fehler bei verschiedenen Indikatoren zu geben, sei ein Versuch aus der Arbeit von *Sörensen* angeführt.

Bei drei Lösungen bestand A aus reiner 0·01 n-Salzsäure, in B und C waren außer der gleichen Menge Salzsäure noch KCl in solchen Mengen, daß die gesamte Chloridkonzentration 0·1 n beziehungsweise 0·3 n betrug.

	Wert von P_H in		
	A	B	C
Die angewandte Meßmethode			
mittelst Berechnung gefunden . . .	2·02	2·04	2·06
elektrometrische Messung	2·01	2·01	2·05
Kolorimetrische Messung mittelst:			
Methylviolett	2·22	2·04	1·91
Mauvein	2·22	2·04	1·91
Gentianaviolett	2·22	2·05	1·89
Methylgrün	2·28	2·05	1·82
p-Benzolsulfonsäure-azo-diphenylamin (Tropäolin 00)	2·00	2·04	2·02
Methaningelb extra	1·99	2·04	2·04
Benzolazodiphenylamin	2·04	2·04	2·04
p-Toluol-azo-benzylamin	2·04	2·02	2·02

[1]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, Zur Frage der Bestimmung der H-Konzentration durch Indikatoren. Zeitschr. f. Elektrochemie. 1908. 251—253.

[2]) *L. Michaelis* und *P. Rona*, Der Einfluß der Neutralsalze auf die Indikatoren. Biochem. Zeitschr. 23. 61 (1909).

[3]) l. c. S. 209.

Die Tabelle beweist die beschränkte Brauchbarkeit der vier ersten Indikatoren. Bei höheren Salzkonzentrationen geben auch die vier letzteren Indikatoren Werte, die mit den elektromotorisch gewonnenen schlecht übereinstimmen.

Eine sorgfältige Berücksichtigung erfordert der „Salzfehler“ der Indikatoren bei der Bestimmung der Reaktion bei salzreichen Lösungen. Um die Größe dieses Fehlers bei Untersuchungen des Meerwassers (mit zirka 35‰ Salz) festzustellen, verfuhren *S. P. L. Sörensen* und *S. Palitzsch* folgendermaßen[1]: Eine Probe Meerwasser von bekanntem Salzgehalt wurde mittelst ¹/₅ n-Salzsäure schwach aber deutlich sauer gemacht, wonach eine Durchleitung von Wasserstoff die Kohlensäure hinaustrieb. Dann wurde die Flüssigkeit durch kohlensäurefreie Natronlauge ganz oder zum Teil neutralisiert und die Wasserstoffionenkonzentration ist durch Zusatz einer kleinen Menge eines passenden Puffergemisches[2] (Zitrat- oder Boratmischungen) nach Wunsch festgelegt und während des ganzen Versuches festgehalten worden. Die H-Ionenkonzentration wurde nun sowohl elektrometrisch als kolorimetrisch gemessen. Der „Salzfehler“ war dann die Differenz zweier Messungen, indem sowohl die Verdünnung des Meerwassers als auch die Salzwirkung der zugefügten kleinen Mengen von HCl, NaOH und Puffermischung vernachlässigt werden kann. Die Bestimmungen wurden mit Wasserproben von entweder zirka 35‰ oder mit zirka 20‰ Salzgehalt ausgeführt. Für die verschiedenen Indikatoren wurden in Mittelwerten folgende Korrektionen gefunden:

a) p-Nitrophenol	35‰ Salz:	—0·12
	20‰ „ :	—0·08
b) Neutralrot	35‰ „ :	+0·10
	20‰ „ :	+0·05
c) α-Naphtholphtalein[3]	35‰ „ :	—0·16
	20‰ „ :	—0·11
d) Phenolphtalein	35‰ „ :	—0·21
	20‰ „ :	—0·16

Die Zahlen sind wie folgt zu verstehen. Ist die Korrektion zu —0·12 gefunden worden, so bedeutet das, daß eine Meerwasserprobe, deren wahrer Wasserstoffionenexponent P_H durch genaue elektrometrische Messung ermittelt, z. B. gleich 6·12 ist, bei der kolorimetrischen Bestimmung dieselbe Farbstärke wie ein Phosphatgemisch, dessen Wasserstoffionenexponent gleich 6·24 ist, zeigen wird. Das richtige Resultat der kolorimetrischen

---

[1]) *S. P. L. Sörensen* und *S. Palitzsch*, Über die Messung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers. Biochem. Zeitschr. **24**. 387 (1910).

[2]) Vgl. *Sörensen*, Enzymstudien. Biochem. Zeitschr. **21**. 201 (1909).

[3]) Bei Benutzung von Phosphatmischungen; bei Anwendung von Boratmischungen ist die Korrektur —0·22 bzw. —0·17.

Messung erhält man daher, wenn man nicht mit dem wahren Wasserstoffionenexponenten der Vergleichsflüssigkeit 6·24, sondern mit dem infolge des Salzfehlers (—0·12) korrigierten (6·24 — 0·12 = 6·12) rechnet. Mit solchen Kautelen ausgeführte kolorimetrische Messungen der Wasserstoffionenkonzentration haben einen Fehler im Wasserstoffionenexponenten, der nie mehr als ±0·1 beträgt und gewöhnlich weit geringer ist.

3. Einfluß zugesetzter Antiseptika: Toluol oder Chloroform. Die Untersuchungen von *Sörensen* zeigen, daß die Genauigkeit der kolorimetrischen Messung mittelst Methylvioletts, Mauveins und ähnlicher Indikatoren nicht durch Toluol beeinflußt wird, während Chloroform nachteilig wirken kann. Von den Indikatoren der Azogruppe werden die sauren gar nicht durch Toluol oder Chloroform beeinflußt, während die basischen in toluol- oder chloroformgesättigten Flüssigkeiten ganz unbrauchbar sind.

4. Änderungen in der Stärke oder der Nuance der Indikatorfarben. Bei Methylviolett und dem verwandten Mauvein, Gentianaviolett, Methylgrün muß man einigermaßen schnell arbeiten, denn die Farbe dieser Indikatoren infolge molekularer Umlagerung schwächt sich in einer gewissen Zeit (schon nach 1/4 Stunde) ab und auch die Nuance wird etwas abgeändert. Bei sehr schwer löslichen Indikatoren kann eine Änderung der Farbe infolge teilweiser Ausscheidung des Indikators eintreten. Während die sauren Indikatoren der Azogruppe (z. B. Tropäolin 00 [p-Benzolsulfonsäure-azo-diphenylamin]) gewöhnlich in wässeriger Lösung verwendet werden können und die Stärke und Nuance der Farbentöne selbst über Nacht sich nicht ändert, müssen die basischen Indikatoren dieser Gruppe (z. B. Benzol-azo-diphenylamin) in alkoholischer Lösung gebraucht werden und die Farbe nimmt beim Stehen an Stärke ab, weil der Farbstoff nach und nach ausflockt. Je zusammengesetzter ein Indikator ist, desto schwer löslicher ist er gewöhnlich und desto störender ist die erwähnte Fehlerquelle.

5. Von sehr großem Einfluß sind die Eiweißstoffe und deren Abbauprodukte, die als amphotere, kolloidale Körper sich mit sauren oder basischen Farbstoffen zu verbinden befähigt sind. Diese Verbindungen fallen aus oder bleiben in (kolloidaler) Lösung und hindern so die kolorimetrische Messung merklich oder vereiteln diese ganz. Die Untersuchungen von *Sörensen* zeigen, daß Methylviolett und verwandte Indikatoren auch durch genuine Eiweißkörper nur wenig beeinflußt werden, während die zahlreichen Indikatoren der Azogruppe sämtlich so gut wie unbrauchbar sind, wenn einigermaßen bedeutende Mengen Proteinstoffe von kolloidaler Natur gegenwärtig sind. Von Bedeutung ist in dieser Hinsicht die Zusammensetzung der Indikatoren. In solchen Fällen, in welchen dieselbe nicht genuine, sondern irgendwie abgebaute Proteine enthält, können die einfacher zusammengesetzten Indikatoren der Azogruppe oft vollkommen zuverlässige Werte geben, während die komplizierter zusammengesetzten Vertreter der Gruppe, vor allem das Kongorot, ganz unbrauchbar sind. Sehr instruktiv

zeigt die vorliegenden Verhältnisse folgender Versuch von *Sörensen*[1]) über den Einfluß der Proteinstoffe auf die Indikatoren. Folgende drei Lösungen wurden untersucht: *a)* eine schwach salzsaure, etwa 2%ige Leimlösung, *b)* eine schwach schwefelsaure, etwa 2%ige Lösung von Wittepepton, *c)* eine schwach salzsaure, etwa 2%ige Lösung von genuinem Hühnereiweiß.

Angewandte Meßmethode:	Wert von P_H in *a*	*b*	*c*
Elektrometrisch	2·56	2·59	2·49
Kolorimetrisch:			
mit Methylviolett	2·61	2·55	2·53
„ Mauvein	2·58	2·52	2·50
„ Benzol-azo-anilin	2·65	2·61	2·81
„ p-Benzolsulfonsäure-azo-anilin	2·61	2·68	3·07
„ Benzol-azo-benzylanilin	2·53	2·57	$\geqq$3·34
„ p-Benzolsulfonsäure-azo-benzylanilin	2·69	2·83	$>$3·68
„ Kongorot	3·50	3·99	$\geqq$5·30

Da der Einfluß auf die Farbenänderung der Indikatoren bei dem genuinen Eiweiß sich zuweilen anders als bei den Abbauprodukten äußert, ist die Farbenänderung gelegentlich ein gutes Zeichen für den fortschreitenden Abbau. Vermischt man z. B.[2]) 40 *cm*³ einer 0·5%igen genuinen Hühnereiweißlösung mit 10 *cm*³ 1-n-Salzsäure und versetzt das Gemisch sofort mit Tropäolin 00, so nimmt die Lösung eine rote Farbe an, die im Laufe von etwa einer Stunde in Gelb übergeht. Dies rührt davon her, daß das gebildete Azidalbumin den Indikator in noch höherem Maße bindet, als es genuines Eiweiß tut: so kann die vorschreitende Azidalbuminbildung leicht verfolgt werden. — Gibt man zu der salzsauren Eiweißlösung wirksame Pepsinlösung, so wird das gebildete Azidalbumin in weniger komplizierte Körper gespaltet; die das Tropäolin nur in geringem Maße binden. Infolgedessen wird der Farbenwechsel von Rot zu Gelb langsamer vor sich gehen und zuletzt, wenn der Pepsinabbau die Oberhand gewinnt, Halt machen, wonach die Flüssigkeit nach und nach wieder rot wird.[3])

Auf Grund seiner Untersuchungen empfiehlt *Sörensen* folgende Indikatoren, die den Bereich der Wasserstoffionenkonzentrationen P_H von 0·1 bis 12·7 beherrschen, zu denen noch das neuerdings empfohlene α-Naphtholphtalein[4]) (mit einem guten Umschlag zwischen $P_H = 7·26$ und $P_H = 8·58$) hinzukommt.

---

[1]) *Sörensen*, l. c. S. 217.

[2]) *Sörensen*, l. c. S. 219.

[3]) Vgl. auch *L. Michaelis* und *H. Davidsohn*, Die isoelektrische Konstante des Pepsins. Biochem. Zeitschr. 28. 1 (1910).

[4]) *S. P. L. Sörensen* und *S. Palitzsch*, Über einen neuen Indikator, α-Naphtholphtalein, mit Umschlag in der Nähe des Neutralpunktes. Biochem. Zeitschr. 24. 381 (1910).

Nr. 1. Methylviolett . . . . P_H = 0·1— 3·2
„ 2. Mauvein . . . . „ = 0·1— 2·9
„ 3. Benzol-azo-diphenylamin . . . . „ = 1·2— 2·1
„ 4. p-Benzolsulfonsäure-azo-diphenylamin . „ = 1·4— 2·6
„ 5. m-Benzolsulfonsäure-azo-diphenylamin . „ = 1·2— 2·3
„ 6. Benzol-azo-benzylanilin . . . . „ = 2·3— 3·3
„ 7. p-Benzolsulfonsäure-azo-benzylanilin . . „ = 1·9— 3·3
„ 8. p-Benzolsulfonsäure-azo-metachlordiäthyl-
anilin . . . . „ = 2·6— 4·0
„ 9. Benzol-azo-dimethylanilin . . . . . . „ = 2·9— 4·0
„ 10. p-Benzolsulfonsäure-azo-dimethylanilin . „ = 3·1— 4·4
„ 11. Benzol-azo-α-naphthylamin . . . . . . „ = 3·7— 5·0
„ 12. p-Benzolsulfonsäure-azo-α-naphthylamin „ = 3·5— 5·7
„ 13. p-Nitrophenol . . . . „ = 5·0— 7·0
„ 14. Neutralrot . . . . „ = 6·8— 8·0
„ 15. Rosolsäure . . . . „ = 6·9— 8·0
„ 16. p-Benzolsulfonsäure-azo-α-naphthol . . . „ = 7·6— 8·9
„ 17. Phenolphtalein . . . . „ ≐ 8·3—10·0
„ 18. Thymolphtalein . . . . „ = 9·3—10·5
„ 19. p-Nitrobenzol-azo-salizylsäure . . . . . „ = 10·1—12·1
„ 20. p-Benzolsulfonsäure-azo-resorzin . . . . „ = 11·1—12·7

Die Messung der normalen Harnazidität auf kolorimetrischem Wege hat *L. J. Henderson*[1]) in folgender Weise ausgeführt: Eine Reihe von Lösungen mit bekannter Wasserstoffionenkonzentration wurde durch Mischen verschiedener Mengen einer schwachen Säure mit ihrem Natriumsalz hergestellt. Die Zusammensetzung und annähernde Wasserstoffionenkonzentration der benutzten Lösungen zeigt folgende Tabelle:

NaH_2PO_4	Na_2HPO_4	(H)	Indikator
0·0010 n	0·0060 n	$4 . 10^{-8}$ n	Neutralrot
0·0010 n	0·0023 n	$1 . 10^{-7}$ n	„
$CH_3 \cdot COOH$	$CH_3 \cdot COONa$		
0·0009 n	0·0920 n	$2 . 10^{-7}$ n	p-Nitrophenol
0·0023 n	0·0920 n	$5 . 10^{-7}$ n	
0·0046 n	0·0920 n	$1 . 10^{-6}$ n	
0·0092 n	0·0920 n	$2 . 10^{-6}$ n	
0·0230 n	0·0920 n	$5 . 10^{-6}$ n	
0·0460 n	0·0920 n	$1 . 10^{-5}$ n	
0·0920 n	0·0920 n	$2 . 10^{-5}$ n	

Diese Lösungen in Flaschen von 250 cm^3 wurden mit dem erforderlichen Indikator versetzt (Konzentration des Neutralrots 0·0005%, des p-Nitrophenols 0·08%) und dienten als Vergleichslösung bei der Bestim-

[1]) *L. J. Henderson*, Zur Kenntnis der Ionengleichungen im Organismus. II. Messungen der normalen Harnazidität. Biochem. Zeitschr. **24**. 40 (1910).

mung der Harnazidität. Bei jeder Bestimmung wurden 10 *cm*³ ganz frischen Harns in eine 250 *cm*³ fassende Flasche gebracht, mit Wasser verdünnt und mit p-Nitrophenol versetzt. Die Konzentration der Wasserstoffionen wurde nun abgeschätzt entweder durch Feststellung der Standardfarbe, mit der die Farbe der Harnprobe übereinstimmte, oder, wenn diese zwischen zwei der Standardlösungen lag, wurde aus den Unterschieden der Farbennuancen durch rohe Abschätzung die Konzentration der Wasserstoffionen bestimmt. War die Azidität geringer als die Konzentration der Wasserstoffionen von $2 . 10^{-7}$, so wurde eine andere Probe mit Neutralrot versetzt und die Farbe mit der Neutralrotseite verglichen. Die infolge der Verdünnung eingetretene Verminderung der Konzentration der Wasserstoffionen betrug in den Versuchen durchschnittlich ungefähr ein Viertel.

Um die Indikatorenmethode zur Messung der Azidität des Magensaftes brauchbar zu machen, hatten *L. Michaelis* und *H. Davidsohn*[1]) die Aichung der Umschlagspunkte der entsprechenden Indikatoren im Magensaft selbst vorgenommen, indem gleichzeitig in einer Gaskette die Wasserstoffionenkonzentration des Magensaftes festgestellt wurde. Die folgende Tabelle zeigt, welche Wasserstoffionenkonzentration des Magensaftes den verschiedenen Nuancen der einzelnen Indikatoren entspricht. Die Zahlen bedeuten die Anzahl Wasserstoffgrammionen im Liter.

	0·1 = $1 . 10^{-1}$	0·032 = $1 . 10^{-1.5}$	0·01 = $1 . 10^{-2}$	0·0032 = $1 . 10^{-2.5}$
Methylviolett . .	grün	grün	grün	grünblau
Tropäolin . . .	burgunderrot	burgunderrot	orange	orange
Kongorot . . .	blau, Niederschlag	blau, Niederschlag	blau, Niederschlag	blauviolett, Niederschlag
Methylorange .	rot	rot	rot	rot
Lackmus . . .	rot	rot	rot	rot
p-Nitrophenol .	farblos	farblos	farblos	farblos
Neutralrot . . .	himbeerrot	himbeerrot	himbeerrot	himbeerrot

	0·001 = $1 . 10^{-3}$	0·0001 = $1 . 10^{-4}$	0·00001 = $1 . 10^{-5}$	0·000001 = $1 . 10^{-6}$	0·0000001 = $1 . 10^{-7}$
Methylviolett	blau	violettblau	blauviolett	violett	violett
Tropäolin	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
Kongorot	blauviolett, Niederschlag	schmutzig-rot	rot	rot	rot
Methylorange	rot	orange	gelb	gelb	gelb
Lackmus	rot	rot	Stich violett	violett	violett
p-Nitrophenol	farblos	farblos	Stich gelb	gelb	gelb
Neutralrot	himberrot	himbeerrot	himbeerrot	himbeerrot	orange

Anmerkung: Bei Mischfarben ist die dominierende zuletzt, die modifizierende zuerst genannt. Wenn bei Methylviolett die Farbennuance schwierig zu beurteilen ist, was mitunter vorkommt, so orientiere man sich an einer Kontrolle von 1 Tropfen Indikator auf 1 *cm*³ destillierten Wassers.

[1]) *L. Michaelis* und *H. Davidsohn*, Die Bedeutung und die Messung der Magensaftazidität. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. 8. 1 (1910).

Bei der Anwendung der beschriebenen Methode ist es ausreichend, vier Reagenzgläschen mit je einem Kubikzentimeter des filtrierten Mageninhalts zu versetzen und als Indikator Methylviolett (0·03%, wässerig), Tropäolin (0·25% in 50% Alkohol), Kongorot (0·125%, wässerig) und Methylorange (0·25%, wässerig) zu verwenden. Die Farben werden im durchfallenden Lichte beobachtet und mit der Tabelle verglichen, aus der die Azidität dann sofort abzulesen ist. Nur bei sehr wenig sauren Magensäften könnte es sich mitunter als zweckmäßig erweisen, zur Kontrolle noch einen der drei zuletzt genannten Indikatoren zu gebrauchen.

Zum Schluß muß noch einmal hervorgehoben werden, daß, obgleich die überaus bequeme Indikatorenmethode zur orientierenden Feststellung der Wasserstoffionenkonzentration vollkommen hinreicht, infolge der erwähnten Fehlerquellen als Standardmethode der Reaktionsmessung das elektrometrische Verfahren angesehen werden muß.

Nachtrag zur Gefrierpunktsbestimmung.

(Vgl. Band I, S. 498.)

Von **P. Rona**, Berlin.

In neuerer Zeit sind einige Vorschläge in der Ausführung des kryoskopischen Verfahrens mit kleinen Flüssigkeitsmengen gemacht worden.

T. Kinoshita[1]) verfuhr dabei folgenderweise: Die Oberfläche des Thermometerteils, der im Gefrierrohr steckt, wird mit Ausnahme des Quecksilberbehälters mit Paraffin überzogen und dieser mit aschenfreiem Filtrierpapier ganz dicht umwickelt. dieses wird mit gereinigten Baumwollfäden daran fest gebunden. Dann wird das Thermometer in die zu untersuchende Flüssigkeit gesteckt. um das Filtrierpapier damit zu tränken: dieses bedeckt man mit Percha lamellata *(Merck)* und verbindet wieder fest mit Fäden. Zuletzt wird das Thermometer in das Gefrierrohr gebracht, und zwar ohne Anwendung von Umrühren und Impfen und zunächst mit Weglassung der Luftmantelröhre. Beginnt hierauf das Thermometer rapid zu fallen, so wendet man zum Schlusse des Experiments die anfangs weggelassene Luftmantelröhre wieder an und bestimmt dann den Gefrierpunkt. Zur Untersuchung sind 3—4. höchstens 5 cm^3 Flüssigkeit nötig. Diese Methode besitzt nach *R. Burian* und *K. Drucker* prinzipielle Fehler. der von dem Weglassen des Rührens herrührt. Bei fehlendem Rühren kann es geschehen, daß die Erstarrungswärme selbst einen recht langsamen Wärmeverlust nicht zu decken imstande ist. Weitere Unzukömmlichkeit ist, daß die nicht gerührte Flüssigkeit in sich ungleich temperiert ist. Ferner ist die Methode keineswegs einfach und verlangt immer noch 3—4 cm^3 Flüssigkeit.

Bereits im Jahre 1903 haben *Guye* und *Bogdan*[2]) bei der Gefrierpunktsbestimmung nach *Beckmann* Vorrichtungen getroffen, die die An-

---

[1]) *Tosaku Kinoshita,* Über eine Modifikation des kryoskopischen Verfahrens für Untersuchung kleiner Flüssigkeitsmengen. Biochem. Zeitschr. **12.** 390 (1908).

[2]) *Guye* und *Bogdan*, Journ. de chem. Phys. **1.** 385 (1903).

wendung von nur 1—1·5 *cm*³ Flüssigkeit gestatten, indem sie ein Thermometer mit sehr kurzem Quecksilbergefäß (9 *mm* Länge und 4·5 *mm* Querdurchmesser. Gradlänge zirka 1 *cm*) benutzten. Die Thermometerröhre hat einen fixen Nullpunkt, die Skala reicht von —5° bis +15° und ist in Zwanzigstelgrade geteilt. Die Ablesungsgenauigkeit beträgt 0·01°. Die Ausführung ist die von *Raoult* angegebene: als Kältebad dient verdampfender Äther, als Rührer wird das Thermometer selbst benutzt.

Da die Ablesungsgenauigkeit bei der Methodik von *Guye* und *Bogdan* für manche Zwecke unzureichend ist, benutzen *Burian* und *Drucker*[1]) ein Thermometer, dessen Quecksilbergefäß bei einer Länge von 9 *mm* einen Durchmesser von 7 *mm* besitzt. Seine mit Stickstoff gefüllte Kapillare ist so eng, daß eine Gradlänge von 2·7 *cm* erzielt wird. Die Skala hat den Umfang von —5° bis +1° und ist in Fünfzigstelgrade geteilt. Es gelingt leicht, mit der Lupe auf 0·002 bis 0·003° genau abzulesen. *Burian* und *Drucker* benutzen ein Eiskochsalzkältebad und wenden einen kleinen Platinrührer mit Glasgriff an. Die Form des Gefrier- und des Mantelrohres ist so wie in der Apparatur von *Guye* und *Bogdan*. Die beiden Rohre besitzen vollkommen gleiche Gestalt. Dem Gefrierrohr fehlt der seitliche Ansatz zur Einführung der Impfkapillare: dieser ist durch eine im Stopfen des Gefrierrohres angebrachte Bohrung ersetzt, durch die die Impfkapillare bequem von oben in die unterkühlte Flüssigkeit hineingebracht werden kann. Jedes der beiden Rohre besteht aus einem weiten oberen und einem engen unteren Abschnitt. Der letztere, der das Quecksilbergefäß des Thermometers und die Versuchsflüssigkeit aufnimmt, hat einen Durchmesser von 14 *mm*. Zur Ausführung der Messung sind 1½ *cm*³ Flüssigkeit eben noch hinreichend. Die Temperatur des Kältebades darf höchstens 2° unter dem Gefrierpunkt der Versuchsstörung liegen. Bei Beobachtung dieser Regel stimmen die Ergebnisse des kleinen Apparates mit denen an dem ursprünglich *Beckmann*schen gewonnenen auf ±0·005° überein.

Was die Anwendung der Gefrierpunktsbestimmung anlangt, so ergeben sich bei den verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten keine wesentlichen Unterschiede in der Ausführung. Bei der Gefrierpunktsbestimmung des Blutes ist es gleich, ob man Serum, defibriniertes Blut oder Gesamtblut anwendet. Hingegen ist die Art der Gewinnung des Blutes auf den Gefrierpunkt, ob spontan abgesetztes oder durch Zentrifugieren gewonnenes, von Einfluß. Änderung des Blutes im Gehalt an Gasen, dann verschiedene Einwirkungen, wie Narkose, Vergiftung, beeinflussen den Gefrierpunkt. Unter normalen Verhältnissen ist die Gefrierpunktserniedrigung des Blutes konstant zwischen —0·517 und —0·562. — Bei der Gefrierpunktsbestimmung der Milch ist ebenfalls auf die Gewinnungsart

[1]) *R. Burian* und *K. Drucker*, Gefrierpunktsmessungen an kleinen Flüssigkeitsmengen. Zentralbl. f. Physiol. 23. 772 (1910). Der Apparat wird von der Firma *Goetze*, Leipzig, geliefert.

und Zeit Rücksicht zu nehmen: die normale Milch hat eine konstante Gefrierpunktserniedrigung: sie ist isotonisch mit dem zugehörigen Blutserum. Eine Schaumbildung beim Rühren ist zu vermeiden. — Beim Harn ist 24stündiger Mischharn oder eine mittelst Ureterkatheter gewonnene Probe zu verwenden. — Bei der Kryoskopie von Organen[1]) wird der Brei des untersuchten Organes in das Gefrierrohr gebracht oder man benutzt den wässerigen Auszug der zerkleinerten Organe, der durch Auskochen mit Wasser und Auspressen der Organstücke gewonnen wird. Der filtrierte klare Saft wird dann zur Gefrierpunktsbestimmung verwendet.

[1]) *Sabbatani,* Arch. di Fisiologia. 4 (1906), Journ. de Phys. et Pathol. gén. III. — *Frédérique,* Bull de l'Acad. Royale de Méd. de Belgique. 1902.

Methoden zur Untersuchung der menschlichen Fäzes.

Von **Hans Lohrisch**, Chemnitz.

A. Vorbereitung des Untersuchungsmateriales.

Das Sammeln des frischen Kotes.

Das Auffangen des Kotes wird am besten in Glasgefäßen vorgenommen. Diese entsprechen in ihrer Form etwa den im klinischen Krankenbetriebe gebräuchlichen Uringläsern, haben aber breiteren Durchmesser und sind am besten mit einem luftdicht schließenden Deckel versehen. Zweckmäßig sind die Gläser aus dickem Glas, damit sich die Versuchsperson eventuell darauf setzen kann. Praktisch ist es auch, wenn die Gläser so hoch sind, daß sie direkt in das Becken eines Wasserklosetts gestellt werden können, so daß die betreffende Person die Fäzes, auf dem Klosett sitzend, direkt in das Glas entleeren kann. Dabei kann gleichzeitig Urin entleert werden, ohne daß die Fäzes mit Urin vermischt werden.

Eine etwaige Beimengung von Urin zu den Fäzes kann eventuell schon erkannt werden an einer stark alkalischen Reaktion und Geruch nach Ammoniak und mikroskopisch durch das Vorhandensein von reichlicher phosphorsaurer Ammoniakmagnesia (Sargdeckelkristalle). Einwandfrei kann die Anwesenheit beigemischten Urins gezeigt werden durch den Nachweis reichlichen Chlors, das sich normalerweise nur sehr spärlich im Kote findet. Dazu stellt man sich nach *Hecht*[1]) ein ziemlich konzentriertes wässeriges Stuhlextrakt her, filtriert und versetzt das Filtrat mit Salpetersäure; dann tropft man so lange 10%ige Argentum nitricum-Lösung dazu, als noch ein Niederschlag entsteht. Bei urinfreien Stühlen kommt höchstens eine leichte Opaleszenz vor. Starker Chlorgehalt wird durch reichliche Trübung oder käsigen Niederschlag nachgewiesen.

Bestimmung der feuchten Kotmenge.

a) Wägung. Zur Bestimmung der Menge des feuchten Kotes wird der Kot in den eben beschriebenen verschließbaren Glasgefäßen, deren Gewicht bekannt und am besten in das Glas eingeritzt ist, aufgefangen. Kommt es auf ganz exakte Wägungen an, so muß der Deckel eingeschliffen und luftdicht schließend sein. Sehr harter und trockener Kot kann auch

[1]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. Die Bedeutung und Technik ihrer Untersuchung. S. 3. Berlin und Wien 1910.

im offenen Glas oder auf offener flacher Schale aufgefangen und gewogen werden, da der Wasserverlust hierbei in der zur Wägung nötigen Zeit unbedeutend ist. Soll der Gesamtkot einer längeren Versuchsperiode bestimmt werden, so wird jede einzelne Kotportion in ein gewogenes Glas für sich entleert, einzeln gewogen und das Gesamtgewicht aus den Einzelportionen berechnet.

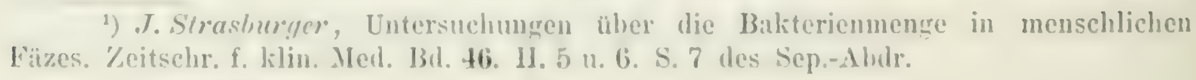
Fig. 94.

b) Volumetrische Messung. Hierzu dient ein von *Strasburger* [1]) angegebenes zylindrisches Gefäß mit aufgeschliffenem Deckel, welches ein Steigrohr trägt (Fig. 94). Das Gefäß ist entweder auf 200 oder 400 *cm*³ geaicht. Der Kot wird in das Glas hineingebracht und das Gefäß mit Wasser aus einem Meßzylinder gefüllt. Eingeschlossene Luft wird durch Umrühren mit einem Holzspatel vertrieben. Es wird bis zur obersten Marke des Steigrohrs aufgefüllt. Das Volumen der Fäzes entspricht der Aichungszahl des Gefäßes, vermindert um die Menge des gebrauchten Wassers.



Fig. 95. Fig. 96.

Um kleine Mengen Kot abzumessen, dient der in Fig. 95 abgebildete kleine *Strasburger*sche Apparat [2]): Dieser stellt eine Bürette dar, die bei der Marke *O* abgeschnitten ist. In derselben befindet sich ein kleiner verschiebbarer Kork, der in der Mitte mit einer glühenden Nadel durchlocht ist und der durch einen Glasstab vorgeschoben werden kann. Zur Abmessung wird zunächst der Kork bis über die gewünschte Marke hinaus in das Rohr hineingeschoben. Mit Hilfe eines Holzspatels wird der Kot in das Rohr gedrückt, ohne daß sich Luft dazwischen ansammelt. Dann schiebt man mittelst des Glasstabes den Kork bis zur gewünschten Marke vor, streicht den überschüssigen Kot vorn am Rohr mit dem Holzspatel ab und kann nun das gewünschte Kotquantum in Form einer Kotsäule aus dem Rohre herausdrücken.



[1]) *J. Strasburger*, Untersuchungen über die Bakterienmenge in menschlichen Fäzes. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **46**. H. 5 u. 6. S. 7 des Sep.-Abdr.

[2]) *J. Strasburger*, l. c. S. 8 des Sep.-Abdr.

Einen ganz ähnlichen Apparat hat neuerdings auch *Sato*[1]) angegeben (Fig. 96).

Dünnflüssige Stühle werden am besten in graduierten Standzylindern gemessen.

Konservierung des Kotes.

Um den feuchten Kot für einige Zeit aufzubewahren, d. h. um die im Kote stattfindenden Fäulnis- und Gärungsprozesse auf einige Zeit zu unterbrechen, empfiehlt es sich, den feuchten Kot mit einer gemessenen Menge dünner Karbollösung (0·25%) oder mit Chloroformwasser zu übergießen oder zu verrühren und in luftdicht schließenden Gläsern aufzubewahren. *Stutzer*[2]) empfiehlt für Tierkot, 100 *g* frischen verriebenen Kot mit 1 cm^3 Schwefelkohlenstoff zu versetzen und das Gemisch in einem Glasgefäß luftdicht abzuschließen. Dabei tritt besonders in den Löslichkeitsverhältnissen der N-haltigen Substanzen keine Veränderung ein. Die Methode ist auch für menschlichen Kot geeignet.

Im allgemeinen empfiehlt es sich, für Analysenzwecke den Kot möglichst schnell zu trocknen, um Zersetzungsvorgänge und die Tätigkeit im Kote vorhandener Fermente möglichst rasch zu unterbrechen.

Abgrenzung des Kotes.

Wenn es sich darum handelt, den gesamten Kot von einer bestimmten Ernährungsperiode zu sammeln (bei Ausnutzungsversuchen usw.), so ist eine genaue Abgrenzung desselben erforderlich. Benutzt wird hierzu nach dem Vorgang von *Ad. Schmidt*[3]) am besten pulverisiertes Karmin. Soll beispielsweise der Kot von 3 Tagen gesammelt werden, so gibt man am Morgen des ersten Versuchstages mit Beginn der Versuchsnahrung 0·3 Karmin in einer Oblate (oder in einem anderen Vehikel, falls die Verabreichung der Oblate den Versuchszwecken zuwiderläuft), ebenso am Ende des dritten Tages mit der letzten Mahlzeit wiederum 0·3 Karmin. Bei der Aufsammlung des Kotes muß nun Beginn und Ende der Ausscheidung roten Karminstuhles genau beobachtet werden. Im vorstehend angegebenen Falle würde der am Beginn und Ende der Versuchsperiode rotgefärbte Kot und der zwischen den roten Portionen liegende Kot zu sammeln sein. Würde man das zweite Karminpulver erst am Beginn des vierten Tages mit der ersten Nahrungsaufnahme geben, so würde der zu Ende des Versuches entleerte Karminkot natürlich nicht mit zu sammeln sein. Die Trennung des Karminkotes von dem vorhergehenden und dem am Ende des

---

[1]) *Ts. Sato*, Über die Bestimmungen der Bakterienmenge in den Fäzes des Menschen. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 7. H. 2. S. 431. 1910.

[2]) *A. Stutzer* (Berichterstatter), *E. Merres* und *L. Seidler*, Die Untersuchung des Kotes auf Gehalt an Stickstoff, der in Form von Stoffwechselprodukten darin enthalten ist. Biochem. Zeitschr. Bd. 9. S. 313—317. 1908.

[3]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. S. 9. 2. Aufl. Wiesbaden 1908.

Versuches nachfolgenden, nicht zum Versuche gehörigen Kot muß sehr sorgfältig geschehen. Es empfiehlt sich hierzu das Aufsammeln jeder Kotportion in einem Glase für sich. Im Glasgefäß kann man zu Anfang und zu Ende des Versuches besonders sehen, ob der Karminkot die unterste oder oberste Schicht bildet, was zur Orientierung bezüglich der Abgrenzung oft wichtig ist. Am besten gelingt die Abgrenzung bei sehr hartem, geformten und dickbreiigen Kote. Schwierig kann es oft sein, bei diarrhoischen Stühlen eine richtige Trennung vorzunehmen. Zur Abtrennung benutzt man 18—20 *cm* lange und $1^1/_2$—2 *cm* breite flache Holzspatel. Die nicht zum gewünschten Kote gehörigen Teile werden mit dem Spatel aus den Gläsern entfernt. Kommt es nicht auf exakte Wägung der feuchten Kotmenge an, so kann man den Kot auch in flache Porzellanschüsseln entleeren lassen, in denen die Abgrenzung mittelst des Spatels mitunter noch leichter und übersichtlicher vor sich geht.

Trocknung und Pulverisierung des Kotes.

Zunächst ist der gesammelte Kot lufttrocken zu machen. Zu diesem Zweck wird entweder der gesamte feuchte Kot in einer gewogenen großen Porzellanschale vereinigt (in den Sammelgläsern haftende Reste werden mit dem Spatel und mit Wasser entfernt und mit dem Gesamtkot vereinigt) und auf dem Wasserbade bei 50—60° eingedampft, oder es wird nur eine kleine Menge (10—15 *g*) des gut durchrührten feuchten Kotes in einer kleinen gewogenen Porzellanschale abgewogen und hierin auf dem Wasserbade getrocknet. Nach dem Eintrocknen wird gewogen und der Wasserverlust festgestellt.

Der lufttrockene Kot wird nun sorgfältig und ohne Verluste aus der Porzellanschale entfernt; der an der Wand der Schüssel oft sehr adhärente Kot muß mit Hilfe eines scharfen zum Schaben geeigneten Instrumentes (schmales scharfes Stemmeisen oder dergleichen) abgekratzt werden, so daß die Schüssel nach Möglichkeit gesäubert ist. Dann wird der Kot entweder in einer Porzellanreibeschale oder im Mörser grob zerstampft oder in einer Handmühle grob geschroten. Der grob zerkleinerte Kot ist nun noch nach Möglichkeit zu pulverisieren. Dies geschieht, indem man die gesamte Kotmenge portionsweise in einer Porzellan- oder Glasreibeschale mittelst eines Pistills zu Pulver verreibt, oder indem man eine der gebräuchlichen Futtermittelmühlen benutzt, von denen *Scheunert* [1]) besonders die *Märker*sche Mühle empfiehlt und abbildet; diese erfordert aber das Vorhandensein maschineller Einrichtungen. Sehr wichtig ist es, bei der Pulverung ohne Verluste zu arbeiten.

Da der Kot während des Pulverisierens in seinem Feuchtigkeitsgehalt Änderungen erfahren haben könnte, ist es ratsam, die gesamte pul-

[1]) *A. Scheunert*, Methoden zur Untersuchung des Speichels und des Inhaltes des Verdauungsschlauches und der Fäzes der Pflanzenfresser. Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, herausgegeben von *E. Abderhalden*. Bd. 3. S. 269. Berlin und Wien 1910.

verisierte Kotmenge wieder in die ursprüngliche Schale, in der der Kot lufttrocken gemacht wurde und in der vielleicht noch einzelne kleine Kotpartikelchen haften, zurückzubringen, noch einmal zu wiegen und dieses Gewicht als das des lufttrockenen Kotes für die Berechnung einzustellen.

Die Aufbewahrung des lufttrockenen Kotpulvers erfolgt in Flaschen und Gläsern mit eingeschliffenem Glasstöpsel oder dicht schließendem Kork in Räumen, deren Feuchtigkeitsgrad nicht zu sehr schwankt.

Hecht [1]) empfiehlt, um das Eindampfen abzukürzen, folgende Methode von *Poda*: Sie beruht darauf, daß der Siedepunkt der zu verdampfenden Flüssigkeit durch wiederholten Alkoholzusatz erniedrigt wird. Man läßt zunächst den Kot in der Porzellanschale 4 Stunden auf schwachsiedendem Wasserbade trocknen. Dann versetzt man ihn mit 50 cm^3 Alkohol und verrührt ihn mit einem Glasstab oder Holzspatel. Nach einer Stunde nochmals Zusatz von 25 cm^3 Alkohol, eventuell noch ein drittes Mal dieselbe Menge. Auf diese Weise hat der Kot dann noch 2—5% Wasser und läßt sich schnell bei 100° zur Gewichtskonstanz bringen.

Vorsichtsmaßregeln beim Eindampfen und Trocknen.

Beim Eindampfen können Fehler entstehen dadurch, daß sich außer dem Wasser noch andere Substanzen (Fettsäuren, aromatische Substanzen, Ammoniak) verflüchtigen. Deshalb dampft man von vornherein, um diese Verluste möglichst niedrig zu gestalten, bei nicht zu hohen Temperaturen ein. Um NH_3-Verluste, die spätere N-Bestimmungen fehlerhaft machen könnten, zu vermeiden, verrührt man die feuchten Fäzes vor dem Eindampfen mit einer geringen Menge stark verdünnter Schwefelsäure oder Weinsäure (1%) oder gibt ein paar Oxalsäurekristalle zu. Kleine Mengen feuchten Kotes können zur möglichsten Vermeidung aller Fehlerquellen im Exsikkator getrocknet werden. Die Luft im Exsikkator kann dabei durch Wasserstoff, Methan und Stickstoff ersetzt werden, auch kann im Vakuum getrocknet werden.

Besondere Vorsicht erfordert die Behandlung stark fetthaltiger Stühle. Hier erfolge schon das Eindampfen bei niederer Temperatur. Da der lufttrockene, stark fettige Kot oft grobe Klumpen bildet und sich sehr schwer pulverisieren läßt, ist es zweckmäßig, den Kot vor dem Eindampfen mit einer genau gewogenen, etwa 10fachen Menge gewaschenen und geglühten Seesandes zu vermischen. Hierdurch wird beim Trocknen das Zusammenballen zu großen Klumpen verhindert und das Pulverisieren des lufttrockenen Kotes erleichtert. Der Sandzusatz kann auch erst vor der Pulverung erfolgen. Immerhin läßt sich auch der mit Sand versetzte Fettstuhl häufig nicht zu einem Pulver verarbeiten, und man muß sich dann mit einer gröberen Beschaffenheit begnügen und etwaige dadurch bedingte Fehler später durch eine größere Zahl von Analysen auszugleichen suchen.

[1]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. Die Bedeutung und Technik ihrer Untersuchung. S. 8. Berlin und Wien 1910.

Derartigen stark fetthaltigen Stuhl kann man auch nicht bei 100° trocknen, da das Fett sich sonst an der Oberfläche des Stuhles ansammelt. Lieber lasse man solche Stühle 30—40 Stunden im Wasserdampftrockenschrank und wiege dreistündlich bis zur Gewichtskonstanz.

B. Untersuchungsmethoden.

Messung des spezifischen Gewichtes.

Ganz dünnflüssige Fäzes können direkt mit dem Aräometer auf ihr spezifisches Gewicht geprüft werden.

Eine genauere Prüfung ist die Wägung im Pyknometer. Hierzu verfährt man nach *Ad. Schmidt*[1]) in folgender Weise: Breiige und feste Fäzes werden in einem bekannten Verhältnisse mit Wasser bis zur flüssigen Konsistenz verdünnt und vermischt, wobei alle im Kot enthaltenen Gasblasen entfernt werden müssen. Die Fäzes müssen frei von makroskopisch erkennbaren Bestandteilen sein, weshalb am besten nur Stuhlgänge von schlackenfreier Nahrung benutzt werden. Von diesen gleichmäßig verrührten Fäzes werden 10 *g* abgewogen und mit 20 *cm*³ destilliertem Wasser unter Vermeidung von Verlusten im Mörser fein verrieben und zur Entfernung eventueller Luftblasen eine Zeitlang stehen gelassen. Die Masse wird dann auf eine Temperatur von 15° C gebracht, unter sorgfältigem Umrühren in das Pyknometer gefüllt und gewogen.

$$\text{Das spezifische Gewicht} = \frac{3\,c - 2\,b - a}{b - a}.$$

a = Gewicht des leeren trockenen Pyknometers.

b = Gewicht des mit destilliertem Wasser von 15° C gefüllten Pyknometers.

c = Gewicht des mit Fäzesmischung gefüllten Pyknometers.

Hecht[2]) erwähnt eine einfache Methode von *H. Strauss*, die darauf beruht, daß man in dem oben beschriebenen *Strasburger*schen Meßglase (S. 232, Fig. 94) das Volumen einer genau gewogenen Menge Kot bestimmt. Das spezifische Gewicht = dem Quotienten aus Gewicht und Volumen.

v. Oefele[3]) geht folgendermaßen vor: Eine Kotprobe wird in destilliertes Wasser gebracht; bei sinkendem Kot wird konzentrierte Kochsalzlösung, bei schwimmendem Kot absoluter Alkohol zugesetzt, bis die Kotmenge schwebt. Die Flüssigkeit, in welcher der Kot schwebt, hat das gleiche spezifische Gewicht wie der betreffende Kot selbst und kann mittelst des Aräometers untersucht werden.

---

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 109. 2. Aufl. Berlin 1905.

[2]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. Die Bedeutung und Technik ihrer Untersuchung. S. 12. Berlin und Wien 1910.

[3]) *F. v. Oefele*, Technik der chemischen Untersuchung des menschlichen Kotes. S. 14. Leipzig 1908.

Die chemische Reaktion der Fäzes.

Die einfachste Methode zur Reaktionsprüfung besteht darin, daß man einen Streifen mit destilliertem Wasser angefeuchteten roten und blauen Lackmuspapieres mit dem Kot auf der einen Seite in Berührung bringt und auf der anderen Seite den Farbenwechsel beobachtet. *Ad. Schmidt*[1]) empfiehlt das aus dem reinen Lackmusfarbstoff dargestellte Azolithminpapier.

Die quantitative Prüfung des Säure- oder Alkaligehaltes wird nach *Blauberg*[2]) in folgender Weise ausgeführt: 20—50 *g* des frischen Kotes werden mit Wasser gut vermischt; dann wird die 10fache Menge gekochten destillierten Wassers zugesetzt und mit Phenolphtalein als Indikator und $\frac{1}{10}$-Normalnatronlauge oder $\frac{1}{10}$-Normalsalzsäure titriert, wobei gut umgerührt werden muß. Statt zu titrieren kann man auch neutrales Lackmuspapier tüpfeln. Die Menge der verbrauchten Säure oder Lauge wird für 100 *g* Kot berechnet und angegeben.

Bestimmung der Kottrockensubstanz.

Der nach dem auf S. 334—335 beschriebenen Verfahren lufttrocken gemachte, pulverisierte und gewogene Kot ist noch nicht wasserfrei. Um ihn völlig trocken zu machen, muß er bei hoher Temperatur bis zur Gewichtskonstanz eingetrocknet werden. Dies geschieht so, daß ein kleines Quantum (einige Gramm) des gut gemischten lufttrockenen Kotpulvers in einem dicht verschließbaren Wiegegläschen abgewogen und im Trockenschrank bei 100—105° getrocknet wird. Das Gläschen mit dem Kote wird alle 2—3 Stunden bei aufgesetztem Deckel gewogen, bis Gewichtskonstanz eingetreten ist. Damit ist die Trocknung des Kotes beendet. Der hierbei ermittelte Wasserverlust + dem Verluste, der beim Eindampfen entstanden ist, ergibt den Wassergehalt des feuchten Kotes.

Untersuchung der Fäzes auf N-haltige Bestandteile.

Die N-haltigen Substanzen, die im Kote vorkommen, sind entweder Nahrungsreste oder Produkte, die vom Körper selbst stammen. Letztere sind entweder Bestandteile der Darmwand selbst oder werden durch die Darmschleimhaut in den Darm ausgeschieden.

Makroskopischer, mikroskopischer und mikrochemischer Nachweis N-haltiger Substanzen.

Außer groben, den Fäzes außen anhaftenden, ohne weiteres sichtbaren Beimengungen von Schleim, Eiter und Blut können eiweißhaltige

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 106. 2. Aufl. Berlin 1905.

[2]) *M. Blauberg*, Experimentelle und kritische Studien über Säuglingsfäzes. S. 42—43. Berlin 1897.

Partikelchen makroskopisch nur sichtbar gemacht werden, wenn der Kot nach *Ad. Schmidts* Vorgang in der Reibeschale sorgfältig mit Wasser verrieben (so daß keine zusammenhängenden Fäzespartikelchen mehr sichtbar sind) und auf einer, am besten schwarzen Unterlage (schwarzer Teller, Makroskopierteller) in dünner Schicht ausgebreitet wird.

Hierzu wird nach *Ad. Schmidt*[1]) in folgender Weise verfahren: Der ganze Stuhl wird zunächst mit dem Holzspatel gründlich durcheinander gerührt und davon eine etwa walnußgroße Probe in eine größere Porzellanreibeschale von ca. 12 *cm* Durchmesser gebracht. Hierin wird der Kot mit dem Pistill, zunächst ohne Wasserzusatz, später unter sehr langsamem Zusetzen destillierten Wassers auf das Feinste bis zu dünnflüssiger Konsistenz verrieben. Diese Art der Verreibung ist für alle makroskopischen Kotuntersuchungen von größter Wichtigkeit. Ganz dünnflüssige Fäzes können ohne Verreiben makroskopisch untersucht werden.

Auf dem Makroskopierteller werden dabei von aus der Nahrung stammenden Eiweißresten sichtbar kleine oder größere weißgraue Bindegewebsfetzen, Sehnen- und Knorpelstückchen, kleine Partikelchen elastischen Gewebes, Fleischstückchen als rotbraune, leicht zerdrückbare und mit der Nadel teilbare Körnchen, Reste von zu hart gebratenem Fleisch und zu scharf gebratenem Ei (Spiegelei), unter Umständen auch Reste von Gehirn und Leber, Knochen und Gräten. Bei ausschließlicher oder vorwiegender Milchnahrung finden sich in Säuglingsstühlen nicht selten außen gelbliche, innen milchig-weiße Kaseingerinnsel. Zu erwähnen sind ferner die *Nothnagel*schen gelben Körner[2]), die eben an der Grenze der makroskopischen Erkennbarkeit stehen. Sehr häufig wird man, um die genannten Substanzen identifizieren zu können, die mikroskopische resp. mikrochemische Untersuchung heranziehen müssen.

Bindegewebe erscheint im Mikroskop grobstreifig und undurchsichtig und enthält zahlreiche elastische Fasern. Bei Zusatz 30%iger Essigsäure verschwindet die Struktur völlig, die elastischen Fasern treten deutlicher hervor. Kalilauge löst Bindegewebe auf. Bringt man mit der Kalilauge etwas Kupfersulfatlösung unter das Deckglas, so kann man an den Bindegewebsresten häufig eine schöne Biuretreaktion erkennen. Auch die Xanthoproteinreaktion (Gelbfärbung beim Erwärmen mit konzentrierter Salpetersäure) gelingt gut, und man kann Bindegewebe dadurch gut von pflanzlichen Gebilden unterscheiden. Dünne Jodlösung färbt das Bindegewebe gelb, dünne Eosinlösung rosa. Ganz dünne Bindegewebsflöckchen können auf schwarzer Unterlage Schleimflöckchen täuschend ähnlich sehen. Gegen Verwechslungen schützen die genannten Reaktionen, besonders der Essigsäurezusatz, wobei Schleim im Gegensatz zum Bindegewebe eine ausgesprochen fädige Struktur annimmt.

[1]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. S. 15. 2. Aufl. Wiesbaden 1908.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 62—64. 2. Aufl. Berlin 1905.

Kleine Fetzen elastischen Gewebes geben im Mikroskop das charakteristische Bild eines Gewirres glänzender Fasern.

Fleischstückchen lassen sich unter dem Deckglase glatt zu dünner Schicht zerdrücken und sind kenntlich an der (in makroskopisch sichtbaren Stücken immer erhaltenen) Querstreifung. Bei Essigsäurezusatz quellen die Fasern auf und werden strukturlos. Kalilauge löst sie. Biuret- und Xanthoproteinreaktion geben sie ebenso wie das Bindegewebe. Mit Millons Reagens (= salpetersaures Quecksilberoxydul: Quecksilber wird in dem gleichen Gewicht Salpetersäure gelöst und mit gleichen Teilen Wasser verdünnt; das Reagens muß stets frisch sein, alte Lösungen kann man durch Zusatz einiger Tropfen Kaliumnitritlösung auffrischen) erwärmt, findet Verlust der Struktur und Rotfärbung statt. Die Muskelfasern geben nach *Hecht*[1]) die Eiweißreaktion besonders schön dann, wenn ihnen der Gallenfarbstoff entzogen worden ist (Hydrobilirubin durch Alkohol, Bilirubin durch Chloroform). Die von *Nothnagel* sogenannten gelben Körner, mohnkorngroße gelblichbraune Gebilde, bestehen mikroskopisch aus kleinen gelben Schollen, die zuweilen von Schleim umhüllt sind. Nach *Ad. Schmidt*[2]) sind auch diese gelben Körner Reste von Muskelstückchen. Kerne sind in den Fleischresten nur bei Störung der Pankreasfunktion zu finden. Sie sind sichtbar zu machen durch Färbung mit dünner Methylenblaulösung unter Essigsäurezusatz.

Die Kaseingerinnsel bestehen mikroskopisch aus netzartig strukturierten Milchresten, in denen sich Schleim-, Fett- und sonstige Kotpartikelchen finden. Sie geben die genannten Eiweißreaktionen und färben sich leicht mit Jod und Eosin. Auch die gelben Körner können Kasein enthalten.

Makroskopisch erkennbare, von der Darmwand stammende eiweißhaltige Produkte sind Schleim, Eiter und Blut.

Schleim ist makroskopisch ohne weiteres sichtbar, wenn er in flüssigen Stuhlgängen in groben Fetzen schwimmt oder (wie bei der Enteritis membranacea) in großen Mengen und groben Bändern und Stücken entleert wird. Sonst ist zur Sichtbarmachung kleiner Schleimmengen der Kot wie oben sorgfältig mit Wasser zu verreiben. Auf dunklem Untergrunde sieht man dann leicht die durchsichtigen, glasigen, größeren und kleineren Schleimflocken. Eventuell muß zur Unterscheidung das Mikroskop herangezogen werden. Hierbei stellt sich der Schleim dar als eine strukturlose oder ganz schwachstreifige durchsichtige Masse mit Einlagerung von Detritus und Zellen (Darmepithelien). Auf Zusatz von 30%iger Essigsäure wird der Schleim dichter, undurchsichtig und zeigt eine ausgesprochen streifigfädige Struktur, wodurch er sich vom Bindegewebe unterscheidet. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal des Schleimes gegenüber Bindegewebe

[1]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 65. Berlin und Wien 1910.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 64. 2. Aufl. Berlin 1905.

ist seine Widerstandsfähigkeit gegen Pepsin — HCl; Bindegewebe löst sich in Pepsin — HCl in wenigen Stunden. In zweifelhaften Fällen kann durch die makroskopische Färbung entschieden werden, ob es sich um Schleim oder Bindegewebe handelt. *Ad. Schmidt*[1] verfährt dazu folgendermaßen: Einige Flocken des Schleimes werden in Wasser gut gereinigt und in einem Reagenzglase mit 2½%igem Sublimatalkohol geschüttelt, um den Schleim zu härten und größere Flocken zu zerkleinern. Dann läßt man sedimentieren, gießt den Sublimatalkohol ab und füllt destilliertes Wasser auf, das man mit einigen Tropfen *Biondi*schen Dreifarbengemisches (*Grübler*-Dresden), 1 *g* auf 30 cm^3 Wasser, versetzt. Damit wird umgeschüttelt, sedimentiert, abgegossen und das Sediment mit destilliertem Wasser gewaschen. Schleimflocken färben sich dabei, wenn sie nicht zu zahlreich oder fetthaltig sind, grün- oder blaugrün, alle anderen tierischen Gewebsbestandteile rot. Bei Anstellung der Probe darf die Reaktion des Stuhles nicht zu weit vom Neutralen abweichen.

Hecht[2]) hat folgende Färbung zur Differentialdiagnose des Schleims gegenüber anderen Gebilden als brauchbar gefunden: 2%iges wässeriges Brillantgrün und 1%ige Neutralrotlösung werden zu gleichen Teilen gemischt, so daß die Flüssigkeit in der Farbe der *Ehrlich*schen Triazidlösung gleicht. Setzt man nun einen Tropfen dieser Lösung einem Klümpchen Stuhl auf dem Objektträger zu und mischt den Kot mit der Farbe innig, so färbt sich alsbald die gesamte Stuhlmasse spinatgrün, während die Flüssigkeit rot wird. Es wird nun ein Filtrierpapierstreifen aufgelegt und darüber gestrichen, um die überschüssige Flüssigkeit zwischen Deckglas und Objektträger auszupressen und abzusaugen. Schon bei schwacher Vergrößerung sieht man, daß in der grün gefärbten Stuhlmenge der Schleim fädig ausgefällt und leuchtend rot gefärbt ist. Bindegewebe färbt sich blaugrün. Zellprotoplasma färbt sich dunkelgrün. Rot färben sich außer dem Schleim nur noch die Zellkerne und Bakterienleiber, rotviolett die Pflanzenzellmembranen. Die Reaktion beruht auf dem sauren Charakter des Schleimes. Bei stark alkalischer Reaktion des Stuhlganges gelingt sie nicht.

Im allgemeinen ist der Schleim, der aus dem Dickdarm stammt, grobflockig und enthält viele Epithelien und Rundzellen, welche den Schleim oft so dicht durchsetzen, daß er direkt weiß aussieht und undurchsichtig wird. Schleim, der aus dem Dünndarm stammt, tritt in kleinen und kleinsten Flöckchen auf, enthält wenig Zellen, meist nur spärliche Zellkerne und viel Bakterien und ist nicht selten durch Gallenfarbstoff gelb gefärbt respektive enthält bei mikroskopischer Betrachtung Bilirubinkristalle.

Die von *Nothnagel* sogenannten hyalinen Schleiminseln sind homogene, matt durchscheinende Klümpchen von etwa Askarideneigröße und meist rundlicher Form. Woraus diese Gebilde bestehen, ist noch nicht

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 35. 2. Aufl. Berlin 1905.

[2]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 53. Berlin und Wien 1910.

bekannt. Sie lassen sich in 10%iger HCl auflösen, werden durch Essigsäure nicht gefällt und enthalten nie irgendwelche Einschlüsse. Nach *Ad. Schmidt*[1]) bestehen sie nicht aus Schleim.

Eiter kann dem Stuhlgang außen in großer Menge anhaften. Kleine Mengen sind makroskopisch sichtbar zu machen durch sorgfältiges Verreiben des Kotes und Ausbreiten auf schwarzem Teller. Hierbei erscheint reiner Eiter in Form kleiner linsenförmiger graugelblicher Häufchen und Tröpfchen, die mikroskopisch aus Eiter bestehen.

Blut ist in frischem Zustande makroskopisch und mikroskopisch leicht zu erkennen, schwerer zersetztes Blut. Reichliche Beimengung zersetzten Blutes macht die bekannte Teerfarbe des Kotes. In zweifelhaften Fällen sind die chemischen Blutproben heranzuziehen.

Die mikroskopische Untersuchung der Fäzes zeigt Muskelbruchstücke auch dann, wenn makroskopisch keine Fleischreste zu sehen sind. Es handelt sich dabei um kleine weißliche und gelbe Stückchen mit rundlichen Ecken oder gröbere zusammenhängende gut erhaltene Fasern, die mit Querstreifung versehen und mikroskopisch wie oben zu identifizieren sind. Auch Bindegewebsstückchen und elastische Fasern sind mikroskopisch zu sehen, auch wenn sie makroskopisch nicht sichtbar sind.

Pflanzliche Eiweißreste sind mikroskopisch erkennbar in Form der unverdaulichen Kleberzellen des Brotes, die ihren eiweißhaltigen Inhalt behalten haben. Die Zellwände sind dabei so fest und undurchgängig, daß es mikrochemisch nicht gelingt, den Zellinhalt als Eiweiß nachzuweisen.

Abbildungen zu dem Vorstehenden sind bei *Ad. Schmidt*[2]) einzusehen.

Chemischer Nachweis der N-haltigen Substanzen. Bestimmung des Gesamt-N im Kote.

Der Gesamt-N-Gehalt der Fäzes wird nach *Kjeldahl* bestimmt. Das Prinzip dieses Verfahrens ist, sämtlichen N durch Kochen mit konzentrierter Schwefelsäure in schwefelsaures Ammoniak überzuführen. Aus diesem wird das Ammoniak nach Übersättigung mit Lauge durch Destillation ausgetrieben und in Normalschwefelsäure aufgefangen. Um die Zerstörung der organischen Substanzen beim Kochen mit Schwefelsäure möglichst zu fördern, wird Quecksilber oder ein Schwermetalloxyd zugefügt.

Bei diesem Verfahren wird außer dem organischen N auch der als Ammoniak schon vorhandene N mitbestimmt. Nicht mitbestimmt wird der N etwa vorhandener Nitrate, da die Salpetersäure der Nitrate durch die Schwefelsäure frei wird und beim Kochen entweicht. Der hierdurch entstehende Fehler ist belanglos, da die Menge etwa vorhandener Nitrate in den menschlichen Fäzes minimal ist. Zusatz von Benzoësäure neben der Schwefelsäure ermöglicht aber auch die Mitbestimmung dieses N.

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 88. 2. Aufl. Berlin 1905.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, l. c. Taf. I—VI.

Benötigt werden an Reagentien:

Ein Schwefelsäuregemisch, das aus 3 Teilen reiner konzentrierter und 1 Teil rauchender H_2SO_4 besteht, oder aus 800 reiner, 200 rauchender H_2SO_4 und 100 Phosphorsäureanhydrit. Natronlauge, eine Lösung von 500 *g* Ätznatron in 500 *cm*³ Wasser. Schwefelkaliumlösung 4·0:100·0, die nach mehrtägigem Stehen zu filtrieren ist. Talk. Quecksilber. $\frac{1}{5}$-Normal-H_2SO_4 und $\frac{1}{5}$-Normal-NaOH. Cochenilletinktur.

Zur Ausführung werden langhalsige *Kjeldahl*-Kolben aus hartem Glas und der für 6—8 gleichzeitige Bestimmungen eingerichtete *Kjeldahl*-Destillierapparat mit Kühler benutzt. Das aus dem Destillationskolben abgehende Destillationsrohr muß einen Kugelansatz haben, um das Überspritzen von Lauge zu verhindern. Ebenso muß das in die Vorlage tauchende Glasrohr eine kugelige Ausbuchtung besitzen, um ein Zurücksaugen der vorgelegten H_2SO_4 zu verhüten.

Zur Bestimmung wird der lufttrockene pulverisierte Kot benutzt, dessen Trockensubstanz bestimmt ist. Von diesem werden zirka 2 *g* im Wiegegläschen gewogen und in einen der langhalsigen *Kjeldahl*-Kochkolben gebracht. Das Hineinschütten des pulverförmigen Kotes in den Kolben muß sehr vorsichtig geschehen, um Verluste und Haften des Kotes im Kolbenhals zu vermeiden. Man benutzt dazu am besten einen langen, weiten, absolut trockenen Glastrichter, der möglichst nahe bis an den Boden des Kolbens reicht. In diesen schüttet man vorsichtig den Kot hinein und befördert die im Trichter anhaftenden Kotpartikelchen mit Hilfe eines trockenen Haarpinsels mit langem Stiele bis in den Kolben hinein und achtet darauf, daß an dem Pinsel nichts hängen bleibt. Man kann den Kot auch in Stanniolpapier eingewickelt in den Kolben bringen. Nun übergießt man den Kot mit 20 *cm*³ des H_2SO_4-Gemischs und fügt dazu einen Tropfen Hg, etwa 0·1 *cm*³, am besten mit einer Kapillarpipette abgemessen. Zweckmäßig ist es nun, das Kölbchen zugestöpselt 12 bis 24 Stunden stehen zu lassen, nachdem man vorher gut durchgeschüttelt hat. Man vermeidet dadurch zu starkes Schäumen beim Kochen. Zum Kochen setzt man den Kolben schräg geneigt auf ein Sandbad unter den Abzug, erhitzt erst langsam, um Schäumen und Spritzen zu vermeiden, dann mit voller Flamme. In einigen Stunden wird der Kolbeninhalt wasserhell, worauf der Kochprozeß beendet ist. Etwaige beim Kochen durch Spritzen im Kolbenhalse haftende schwarze Partikelchen spült man durch vorsichtiges Schütteln und Schwenken der Lösung in den Kolben zurück und kocht nochmals auf.

Die wasserklare Lösung ist nun verlustlos in den Destillationskolben, einen zirka $^1/_2$ *l* fassenden Kochkolben, zu bringen. Zu diesem Zwecke füllt man nach Erkalten der Lösung in den *Kjeldahl*-Kolben langsam 50 *cm*³ Aq. dest. zu, schwenkt um und gießt die wieder heißgewordene, jetzt verdünnte Lösung in den Destillationskolben über. Es scheidet sich dabei etwas Quecksilbersulfat aus, welches bei mehrmaligem Nachspülen in Lösung geht. Man spült 2—3mal nach, so daß man zum Reinspülen des *Kjeldahl*-Kolbens im ganzen nicht mehr als 200 *cm*³ Wasser braucht. Hierauf kühlt man den Kolben unter der Wasserleitung, setzt rasch nacheinander 50 *cm*³ Natronlauge (vorsichtig wegen eventuellen starken Schäumens), 40 *cm*³

Schwefelkaliumlösung, einen reichlichen Kaffeelöffel Talk und nochmals 50 *cm*³ Lauge zu, verschließt sofort, ehe NH_3 entweichen kann, mit dem Destillationsrohr, bringt den Kolben auf das schon vorgewärmte Sandbad und läßt nun die Destillation in eine Vorlage (*Erlenmeyer*-Kolben), welche mit 50 *cm*³ $\frac{1}{5}$-Normal-H_2SO_4 beschickt ist, vor sich gehen.

Der Zusatz von Schwefelkalium hat den Zweck, etwa vorhandenes Quecksilberamid zu zerlegen und das Quecksilber zu fällen. Durch den Talkzusatz wird starkes Stoßen der Flüssigkeit beim Kochen verhindert. Wichtig ist auch, daß der Destillierkolben auf ein vorher schon erhitztes Sandbad gebracht wird. Geschieht die Erwärmung der Mischung zu langsam, so erfolgt zuweilen ein rasches Ansaugen der $\frac{1}{5}$-Normal-H_2SO_4 aus der Vorlage in den Destillationskolben. Erfolgt während der Destillation gelegentlich ein derartiges stärkeres Ansaugen, so ist die Erhitzung eventuell noch durch eine zweite Gasflamme zu verstärken.

Nach 20 Minuten Kochzeit kann man darauf rechnen, daß die Destillation vollendet ist. Soll dann der Kochprozeß unterbrochen werden, so öffnet man zunächst den Verschluß des Destillierkolbens und löscht dann erst die Flamme. Das in die Vorlage tauchende Rohr wird mit Wasser in die Vorlage hinein ab- und durchgespült. Hierauf wird mit $\frac{1}{5}$-Normal-NaOH austitriert, wieviel Kubikzentimeter der vorgelegten H_2SO_4 durch Ammoniak gesättigt worden sind. Indikator ist Cochenilletinktur, von der etwa 10 *cm*³ zugegeben werden. Die Menge der gesättigten H_2SO_4 = der Zahl der vorgelegten Kubikzentimeter H_2SO_4 minus der Zahl der zum Titrieren gebrauchten Kubikzentimeter Normallauge. Die Zahl der in der verwendeten Kotmenge enthaltenen Milligramme N erhält man, wenn man die Zahl der durch NH_3 gesättigten Kubikzentimeter $\frac{1}{5}$-Normal-H_2SO_4 mit 2·8 multipliziert (1 *cm*³ $\frac{1}{5}$-Normal-NaOH enthält $^{40}/_5$ *mg* NaOH und entspricht 17·5 *mg* NH_3 oder $^{14}/_5$ = 2·8 *mg* N).

Bei jeder N-Bestimmung ist mindestens eine Kontrollanalyse auszuführen. Die N-Bestimmungen können auch mit feuchtem Kote ausgeführt werden. Man vermeidet dabei etwaige beim Trocknen entstehende NH_3-Verluste.

Nachweis löslicher und koagulabler Eiweißkörper in den Fäzes.

Der Nachweis geschieht im wässerigen Fäzesextrakt. In jedem Stuhlgang findet sich dabei ein mit Essigsäure in der Kälte fällbarer Eiweißkörper, das Nukleoproteid der Fäzes. Dieses ist, wie alle Nukleine, eine Verbindung von Eiweißkörpern mit der Nukleinsäure. Es ist aber kein einheitlicher Körper, sondern ein Gemisch verschiedener Nukleoproteide und Nukleine. Eine hervorstechende Eigenschaft des Fäzesnukleoproteids ist seine Fähigkeit, sich im Essigsäureüberschuß nach vorheriger Ausfällung wieder zu lösen. Das Nukleoproteid entstammt den Zellkernen, bei deren Zerfall es frei wird. Das Vorkommen dieses Eiweißkörpers im Kote erklärt sich so, daß Zellzerfall im Darmkanal jederzeit in ausgedehnter Weise stattfindet, indem sowohl mit der Nahrung eingeführte Zellen verdaut werden als auch Darmepithelien in großer Anzahl degenerieren und zerfallen. Die Nukleoproteide werden zum allergrößten Teil in

Eiweiß und Nukleine gespalten, diese können weiterhin in die Nukleinbasen (Purinkörper) zerfallen. Der Essigsäureniederschlag besteht aber nicht nur aus den Nukleinsubstanzen, sondern auch aus Muzin und Kasein. Vom Kasein nimmt man an, daß es im Kote Erwachsener normalerweise nicht vorkommt.

Die Muzine sind Glykoproteide, die bei der Spaltung in einen Eiweißkörper und ein Kohlehydrat zerfallen. Sie sind im Gegensatz zum Nukleoproteid stets phosphorfrei, lösen sich im Essigsäureüberschuß nicht und spalten beim Kochen mit 7·5%iger Salzsäure schon nach wenigen bis höchstens 10 Minuten eine stark reduzierende Substanz ab, während das Nukleoproteid erst nach längerem Kochen eine schwache Reduktion gibt. Nach den spärlichen bisher vorliegenden Untersuchungen kommt Schleim im normalen Stuhle bei normaler Beschaffenheit der Darmschleimhaut nicht vor, sondern nur in pathologischen Fällen. Man kann sich im allgemeinen damit begnügen, den Schleim makroskopisch und mikroskopisch nachzuweisen.

Unter pathologischen Verhältnissen ist der Nukleoproteidgehalt der Fäzes gesteigert. Ferner kommt unter pathologischen Verhältnissen in den Fäzes Albumin vor, welches in der Hauptsache von der Darmwand selbst abstammt (Serumalbumin). Noch seltener treten Albumosen auf. Ihr Erscheinen deutet auf eine schwere Schädigung des Darmes hin, braucht aber nicht in jedem Falle auf Störungen der Resorption von Nahrungseiweiß zu beruhen.

Verfahren nach *Schloessmann.*[1])

Der gemeinsame Nachweis des genuinen Eiweißes und der Albumosen ist in einwandfreier Weise erst möglich, wenn das Nukleoproteid entfernt und das nukleoproteidfreie Filtrat klar ist.

Zur Entfernung des Nukleoproteids benutzt man seine Eigenschaft, mit dünner Essigsäure auszufällen. Man verwendet nach *Schloessmann*[1]) 30%ige Essigsäure, muß aber sehr vorsichtig zusetzen, um einen Überschuß von Essigsäure zu vermeiden, in dem sich das Nukleoproteid wieder lösen könnte. Es kommt also darauf an, das Fällungsmaximum zu treffen, was bei Übung und Geduld möglich ist. Von der 30%igen Essigsäure sind selbst in Fällen, wo nur geringe Mengen Nukleoproteid vorhanden sind, immer noch einige Tropfen nötig, ehe das Fällungsmaximum erreicht ist. Als Hilfsmittel zur sicheren Ermittlung, ob alle fällbare Substanz niedergeschlagen ist, empfiehlt *Schloessmann*[1]) wiederholtes Filtrieren der Lösung vom Niederschlage. Das Filtrat, welches meist klar oder nur schwach getrübt ist, wird dann mit wenigen Tropfen 5—10%iger Essigsäure versetzt. Entsteht dabei keine weitere Trübung, so ist die Ausfällung beendigt.

Tsuchiya[2]) schlägt hierzu noch folgendes vor: Um die Nukleoproteide vor Anstellung der Eiweißprobe möglichst vollständig zu entfernen, was, wie erwähnt, zuweilen schwierig ist, ist es zweckmäßig, die Reaktion der Flüssigkeit genau mit Lackmus zu prüfen und bei saurer Reaktion eine kleine, bei neutraler eine mittelgroße, bei alkalischer eine große Menge Essigsäure zuzusetzen, so daß die Endreaktion immer mäßig

[1]) *H. Schloessmann*, Über Nachweis und Auftreten gelösten Eiweißes in den Fäzes Erwachsener. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **60**. H. 3 u. 4. 1906. S. 5 des Sep.-Abdr.

[2]) *J. Tsuchiya*, Über das Auftreten des gelösten Eiweißes in den Fäzes Erwachsener und sein Nachweis mittelst der Biuretreaktion. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 5. 1908. S. 3 des Sep.-Abdr.

stark sauer ist. Ferner rät *Tsuchiya*[2]), das Hydrobilirubin möglichst reichlich aus dem Extrakt zu entfernen, da Hydrobilirubin zuweilen schon allein Biuretreaktion gibt. Hierzu soll das Hydrobilirubin mittelst Chloroform aus dem mit Alkohol versetzten Extrakt ausgeschüttelt werden (Alkohol ist nötig, weil Chloroform ohne Alkohol nur sehr wenig Farbstoff aufnimmt). Näheres über diese beiden Modifikationen *Tsuchiyas* siehe S. 346—347.

Der Nukleoproteidniederschlag muß nun abfiltriert werden. Hierzu benutzt man nach *Schloessmann*[1]) Filter, die mit Kieselguhr bestreut sind. Kieselguhr ist imstande, feinste Trübungen zurückzuhalten. Doch muß man, wie *Schloessmann*[1]) zeigte, peinlichst vermeiden, die Extrakte mit Kieselguhr zu schütteln, weil Kieselguhr wie alle porösen Substanzen imstande ist, Eiweiß festzuhalten. *Schloessmann* fand z. B., daß es in einer 0·5%igen Serumlösung gelang, durch energisches Schütteln mit viel Kieselguhr alles Albumin zu binden, so daß eine Eiweißreaktion im Filtrat nicht mehr zu erzielen war.

Im einzelnen ist nach *Schloessmann*[2]) folgendermaßen zu verfahren:

Die Fäzes (Tagesmenge) werden unter langsamem Zusetzen von Wasser gut verrieben und weiterhin mit Wasser bis zu ziemlich dünnflüssiger Konsistenz (ca. 500 cm^3) verdünnt. Einige Stunden stehen lassen. Filtrieren durch doppeltes Faltenfilter. Trübes Filtrat zur Klärung durch ein mit wenig reinem Kieselguhr beschicktes Filter filtrieren. Danach ist das Filtrat klar. Durch sehr vorsichtigen Zusatz von 30%iger Essigsäure Ausfällen der Nukleoproteide im Reagenzglase. Die hierbei entstehende Trübung wird durch doppeltes Filter ein- beziehentlich mehrmals abfiltriert.

a) Erhält man dadurch wasserklare Filtrate, so überzeugt man sich durch Zusatz von wenigen Tropfen 3—5%iger Essigsäure, ob alles Nukleoproteid ausgefällt ist und stellt dann die Eiweißprobe an.

b) Bleiben die Filtrate trüb, so läßt man sie jetzt nochmals durch ein kleines mit wenig Kieselguhr bestreutes Filter hindurchgehen und untersucht in den nunmehr stets klaren Lösungen auf Eiweiß, nachdem man zuvor die Kontrollprobe auf vollständige Entfernung der Nukleine gemacht hat.

Die Prüfung des klaren und nukleoproteidfreien Filtrats auf Eiweiß wird vorgenommen als Essigsäurekochprobe unter NaCl-Zusatz (bei zu geringem Salzgehalt der Fäzes wird die Reaktion undeutlich), als Salpetersäure-Ringprobe und als Ferrozyankaliumprobe. Die Menge des vorhandenen Eiweißes kann entweder mit dem *Esbach*schen Reagens oder, wie neuerdings *Tsuchiya*[3]) vorschlägt, mit einer 1%igen alkoholischen Phosphorwolframsäurelösung (Phosphorwolframsäure 1·0, Salzsäure 5·0, 96%iger

[1]) *H. Schloessmann*, Über Nachweis und Auftreten gelösten Eiweißes in den Fäzes Erwachsener. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **60**. H. 3 u. 4. 1906. S. 7 des Sep.-Abdr.

[2]) *H. Schloessmann*, l. c. S. 9 des Sep.-Abdr.

[3]) *J. Tsuchiya*, Die volumetrische Eiweißbestimmung mittelst der Phosphorwolframsäure. Zentralbl. f. innere Med. Nr. 24. S. 605—609. 1908.

Alkohol 100,0) bestimmt werden. Diese Lösung soll vor allen Dingen für geringe Eiweißmengen genauer arbeiten als das *Esbach*sche Reagens. *Tsuchiya* hat dafür besonders geaichte Meßgläschen angegeben.

Um zu unterscheiden, ob der Eiweißniederschlag aus Albumin besteht oder ob daneben noch Albumosen vorhanden sind, gibt es folgende qualitative Unterscheidungsmöglichkeiten (*Schloessmann*[1]):

Vorsichtiges und langsames Erwärmen des bei der Ferrozyankaliumprobe entstandenen Niederschlages. Sind Albumosen in der Fällung, so lösen sich dieselben bei ca. 70° wieder auf und die Trübung schwindet mehr oder weniger. Wenn man nun, ohne weiter zu erhitzen, das Reagenzglas rasch abkühlt, so fallen die Albumosen wieder aus und die Trübung nimmt zu.

Setzt man zu dem vom Nukleoproteid befreiten klaren Filtrate Salpetersäure im Überschuß zu, so bleibt ein Eiweißniederschlag bestehen, ein Albumoseniederschlag löst sich im Überschuß von Salpetersäure wieder.

Die mit Essigsäure stark angesäuerten Lösungen werden zu $^1/_6$ ihres Volumens mit konzentrierter Kochsalzlösung versetzt. Hierbei gibt es schon in der Kälte bei starkem Eiweißgehalt einen Niederschlag. Löst sich dieser beim Erwärmen, so besteht er nur aus Albumosen. Sind Albumin und Albumosen vorhanden, so scheiden sich die Albumosen aus dem warmen Filtrate der gekochten Mischung beim Erkalten wieder aus, während Eiweiß auf dem Filter zurückbleibt.

Wie *Schloessmann*[2]) bemerkt, werden durch diese Albumosenproben immer nur erheblichere Albumosenmengen nachgewiesen, so daß also selbst spurweise Trübungen berücksichtigt werden können.

Erinnert sei hierbei daran, daß das im Filtrat nachweisbare Eiweiß mit dem unverdauten Nahrungseiweiß in keinem Zusammenhange steht.

Simon[3]) hat vorgeschlagen, wenn sich beim Abfiltrieren des Nukleoproteids durch Papierfilter keine klare Lösung erhalten läßt, die Trübung im Überschusse der Essigsäure wieder zu lösen und dann die Eiweißproben anzustellen. *Schloessmann*[4]) hat aber gezeigt, daß sich das wieder gelöste Nukleoproteid durch Ferrozyankalium zum Teil ausfällen läßt. Man ist also bei diesem Verfahren Täuschungen ausgesetzt, und der Ferrozyankaliumniederschlag darf nur dann als Eiweißniederschlag gelten, wenn er deutlich stärker ist, als es der Nukleoproteidniederschlag war.

Vereinfachtes Verfahren zum gemeinsamen Nachweise von Albumin und Albumosen mit Hilfe der Biuretreaktion von *Tsuchiya*.[5])

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß man zunächst im wässerigen Fäzesextrakt die Nukleoproteide sich vollkommen niederschlagen läßt und das Hydrobilirubin möglichst entfernt. Wenn man alsdann in das

---

[1]) *H. Schloessmann*, Über Nachweis und Auftreten gelösten Eiweißes in den Fäzes Erwachsener. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. **60**. H. 3 u. 4. 1906. S. 16 u. 17 des Sep.-Abdr.

[2]) *H. Schloessmann*, l. c. S. 20 des Sep.-Abdr.

[3]) *O. Simon*, Über das Vorkommen und den Nachweis gelöster Eiweißkörper in den Fäzes. Arch. f. Verdauungskrankheiten. Bd. **10**. H. 3. 1904. S. 197—203.

[4]) *H. Schloessmann*, l. c. S. 8 des Sep.-Abdr.

[5]) *J. Tsuchiya*, Über das Auftreten des gelösten Eiweißes in den Fäzes Erwachsener und sein Nachweis mittelst der Biuretreaktion. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 5. 1908.

so behandelte Fäzesextrakt ein kleines Stück Kupfersulfatagar hineinwirft. quillt dieses nach einiger Zeit auf und saugt die nukleoproteid- und hydrobilirubinfreie Flüssigkeit an. Taucht man diesen Kupfersulfatagar sodann in Natronlauge, so zeigt sich, wenn in den Fäzes gelöstes Eiweiß enthalten ist, die Biuretreaktion.

Die Herstellung des Kupfersulfatagars geschieht folgendermaßen: 2 *g* Agar-Agar werden mit 100 cm^3 Wasser in einer Porzellanschale gekocht, bis das Ganze gelöst ist. Zu dieser dickflüssigen Lösung Zusatz von 10 cm^3 einer 10%igen Kupfersulfatlösung und Umrühren derselben. Abgießen der Mischung in Glasröhrchen von ungefähr 20 bis 30 *cm* Länge und 0·8—1·0 *cm* Durchmesser. Diese Glasröhrchen sind vorher an einem Ende mit einem Kork verschlossen worden. Nachdem die Lösung hineingegossen ist, verschließt man auch das offene Ende mit einem Kork oder einem metallischen Deckel, um das Austrocknen zu verhüten. Der Agar läßt sich dann feucht lange Zeit aufbewahren. Zum Gebrauche schiebt man den Kork auf der einen Seite des Glasröhrchens immer weiter in dasselbe hinein, so daß der erstarrte Kupfersulfatagarzylinder auf der anderen Seite heraustritt, wo man für die Versuche etwa 1 *cm* dicke Scheiben abschneiden kann.

Die Methode wird in folgender Weise ausgeführt: Eine taubeneigroße Menge der gut vermischten ganzen Fäzesmenge wird unter Zusatz von Wasser nochmals verrieben und bis zu ziemlich dünnflüssiger Konsistenz verdünnt. Von dieser Flüssigkeit gibt man 10 cm^3 in einen Porzellanmörser und prüft mit Lackmus genau die Reaktion. Je nach der Art der Reaktion fügt man mehr oder weniger 10%igen Eisessigalkohol (10·0 cm^3 Eisessig: 90 cm^3 95%igem Alkohol) dazu, am besten folgendermaßen:

bei mäßig saurer Reaktion 0·5 cm^3,
bei schwachsaurer oder neutraler Reaktion 1·0 cm^3,
bei schwachalkalischer Reaktion 1·5 cm^3,
bei starkalkalischer Reaktion 2·0—2·5 cm^3.

Nach dem Zusatz von Eisessigalkohol wird die ganze Masse wiederum gut verrieben. Hierauf setzt man ca. 5 cm^3 Chloroform hinzu und verreibt 3mal. Dann gießt man die ganze Flüssigkeit in ein Reagenzglas und läßt sie stehen. Nach einigen Minuten sinken die groben Partikelchen des Fäzesextraktes zusammen mit dem Chloroform zu Boden, während sich eine meist hellgelbe, manchmal schwach bräunlichgelbe, feingetrübte Flüssigkeit oben abscheidet. Diese letztere gießt man in ein zweites Reagenzglas und wirft ein Scheibchen Kupfersulfatagar hinein. Eine Stunde danach nimmt man die Agarscheibe heraus und wäscht sie mit Wasser aus. Ist das Fäzesextrakt eiweißreich, so behält der Agar zumeist seine schöne tiefblaue Farbe; wenn Eiweiß nur in Spuren oder gar nicht vorhanden ist, so ist er bräunlich-hellblau gefärbt. Man schneidet nun ein kleines Stück von dem Scheibchen ab und bringt dasselbe in ein Porzellanschälchen oder in eine auf weißem Papier stehende Glasschale.

Ist in den Fäzes gelöstes Eiweiß vorhanden, so tritt auf Zusatz von verdünnter Natron- resp. Kalilauge am Rande des Scheibchens sofort eine schöne Biuretreaktion von hellvioletter Farbe mit einem Stich ins Blaue auf. Die ganze Untersuchung kann in 1½ Stunden beendet sein.

Unterscheidung zwischen Nukleoproteid und Muzin.

Hierzu sind die oben erwähnten Eigenschaften des Muzins (frei von Phosphor, im Essigsäureüberschuß nicht löslich, Abspalten eines reduzierenden Körpers beim Kochen mit HCl) zu benutzen. Das Reduktionsvermögen wird festgestellt, indem man den auf dem Filter gesammelten Niederschlag abhebt, mit 7·5%iger HCl im Wasserbad ca. 10 Minuten kocht, filtriert, kühlt, mit starker Natronlauge alkalisiert, Kupfersulfat zusetzt und erhitzt.

Um zu entscheiden, ob ein auf Essigsäurezusatz erfolgender Niederschlag P-haltig ist oder nicht, wird in folgender Weise verfahren: Der Niederschlag wird mit der 30fachen Menge eines Gemisches von 3 Teilen KNO_3 und 1 Teil Na_2CO_3 geschmolzen, die Schmelzmasse in Wasser gelöst, vorsichtig HNO_3 zugesetzt, HNO_2 durch Kochen ausgetrieben und die Flüssigkeit im Wasserbade eingeengt. Dann wird mit salpetersaurer Lösung von molybdänsaurem Ammonium und Magnesiamixtur gefällt und die P-Säure als Magnesiumpyrophosphat gewogen (*Hecht*[1]).

Brutschrankprobe nach *Ad. Schmidt*[2]) zum Nachweis gelösten Eiweißes in den Fäzes.

Hierzu wird das *Strasburger*sche Gärungsröhrchen (Fig. 100, S. 370) benutzt. In das Grundgefäß kommt von dem gut durchrührten unverdünnten Kot, dessen Reaktion genau festgestellt wird, eine zirka walnußgroße Portion (bei sehr harten Stühlen weniger, bei weichen mehr, bei flüssigen füllt man ganz ein), die mit dem Holzspatel und Wasser gut verrührt wird. Das Röhrchen wird dann wie bei der Anstellung der Gärungsprobe (S. 370—371) verschlossen und für 24 Stunden bei 37° in den Brutschrank gebracht. Nach dieser Zeit notiert man die Höhe des durch eventuelles Gas verdrängten Wassers im Steigrohr, öffnet das Grundgefäß und prüft die Reaktion seines Inhaltes. Deutlicher Umschlag der Reaktion nach der alkalischen Seite, intensiver Fäulnisgeruch, dunklere Färbung des Kotes und mäßige oder geringe Gasentwicklung zeigen das Vorhandensein einer Eiweißfäulnis an. Auch hierbei faulen nur vom Darm selbst stammende Eiweißkörper, nicht etwa Reste des Nahrungseiweißes.

Nachweis der Albumosen nach *Ury*.[3])

Die Tagesmenge der Fäzes wird mit 2%iger Essigsäure verrieben, dann auf 1 *l* aufgefüllt und filtriert. Das gesamte Filtrat wird auf 300 bis 400 *cm*³ eingeengt, mit der gleichen Menge 96%igem Alkohol oder etwas

[1]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 54. Berlin und Wien 1910.

[2]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. S. 20—21. 2. Aufl. Wiesbaden 1908.

[3]) *H. Ury*, Zur Methodik des Albumosennachweises in den Fäzes. Arch. f. Verdauungskrankheiten. Bd. 9. H. 3. S. 219—249. 1903.

mehr versetzt, jedenfalls so lange, bis ein Niederschlag erfolgt. Filtration. Das Filtrat wird neuerdings stark eingeengt und mit der 8fachen Menge absolutem Alkohol gefällt. Der Niederschlag wird mit Alkohol bis zur Farblosigkeit des Alkohols ausgewaschen, mit Äther nachgewaschen und verrieben. Man extrahiert nun den Niederschlag gründlich mit wenig (etwa 15 *cm*³) warmem Wasser und Kalilauge und filtriert. Das tief schwarzbraune Filtrat wird mit H_2O_2 bis zur Gelbfärbung gekocht und nach dem Erkalten mit verdünnter Kupfersulfatlösung versetzt. Es tritt dann bei Anwesenheit von Albumosen Biuretreaktion ein.

Nachweis des verdaulichen Nahrungseiweißes im Kot nach Ad. Schmidt.[1])

Mit den vorstehenden Untersuchungsmethoden werden, wie schon erwähnt, nur Eiweißsubstanzen nachgewiesen, die vom Körper resp. von der Darmschleimhaut selbst stammen.

Schmidt[1]) hat nun folgendes Verfahren angewendet, um die Menge des etwa noch vorhandenen verdaulichen Nahrungseiweißes schätzungsweise bestimmen zu können. Das Prinzip ist das der künstlichen Nachverdauung des gereinigten Bodensatzes einer zentrifugierten Kotaufschwemmung, wobei aus dem Sediment alle Eiweißbestandteile verschwinden.

Von der gleichmäßig verrührten Masse des frischen Kotes mißt man mit dem *Strasburger*schen oder *Sato*schen Glasrohr (S. 332, Fig. 95 u. 96) eine annähernd 0·25 *g* Trockensubstanz enthaltende Menge ab. Dieselbe beträgt bei mittlerer Konsistenz des Kotes durchschnittlich 1 *cm*³, bei harter etwa 0·8 *cm*³, bei flüssiger etwa 3 *cm*³. Dieses Quantum wird mit wenigen Kubikzentimetern destillierten Wassers in einem Glas- oder Achatmörser aufs feinste verrieben und in ein Schleudergläschen der gewöhnlichen Handzentrifuge mit soviel Wasser gespült, daß das etwa 9—10 *cm*³ fassende Gläschen bis oben gefüllt ist. Erscheint die Verdünnung für ein schnelles Zentrifugieren nicht groß genug, so verteilt man den Inhalt auf 2—4 Gläschen, die man alle mit Wasser auffüllt.

Jetzt wird etwa ½ Minute lang zentrifugiert, die trübe Flüssigkeit vom Bodensatz abgegossen und der letztere durch kräftiges Ausschütteln mit destilliertem Wasser von neuem aufgeschwemmt. Nach Wiederholung des Verfahrens wird statt Wasser 0·4%ige HCl-Lösung aufgegossen, umgeschwenkt, ausgeschleudert und dasselbe der Reihe nach mit Alkohol, Äther, Alkohol und Wasser wiederholt. Im ganzen wird also siebenmal je ½ Minute zentrifugiert, wobei der Bodensatz durch sukzessive Lösung seiner Bestandteile immer mehr abnimmt, so daß die eventuell vorher geteilten Portionen bald wieder vereinigt werden können. Nachdem das letzte Wasser vom Bodensatz abgegossen ist, wird er mit 8 *cm*³ Magensaft

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 55—56. 2. Aufl. Berlin 1905.

resp. Pepsin-Salzsäurelösung aufgeschwemmt und in das Meßgläschen (Fig. 97 [1]) gegossen.

Dieses Meßgläschen besitzt dieselbe Länge wie die übrigen Schleudergläschen und an seinem unteren Ende eine 2 *cm* lange Verjüngung, welche sich ziemlich scharf an das weitere obere Ende ansetzt. Der lichte Durchmesser des oberen 6 *cm* langen Endes beträgt $1\frac{1}{2}$ *cm*, der des unteren Ansatzes 0·5 *cm*. Dieser Ansatz trägt eine von unten ausgehende Millimeterskala (im ganzen 20 *mm*) und faßt somit etwa 0·4 *cm*³, d. h. pro Teilstrich 0·02 *cm*³ Flüssigkeit. Das ganze Röhrchen faßt 8—9 *cm*³.

Fig. 97.

In diesem Meßgläschen wird jetzt nochmals, und zwar besonders sorgfältig zentrifugiert und die Höhe des Bodensatzes an der Skala des verdünnten Endes abgelesen. Sollte dessen Höhe über 20 *mm* hinausgehen, so verteilt man die aufgeschüttelte Flüssigkeit auf 2 Gläschen. Nach erneutem gründlichen Aufschütteln wird das Gläschen mit einem gutsitzenden Stöpsel verschlossen und in den Brutschrank gelegt. Nach 24 Stunden wird es herausgenommen und von neuem zentrifugiert. Die Differenz der Bodensatzhöhen vor und nach der Verdauung gibt den Maßstab für die Menge der verdauten Eiweißreste (Muskelfasern, Bindegewebe) ab.

Der Magensaft wird am besten so hergestellt, daß die Schleimhaut eines Schweinemagens abpräpariert, gehackt und mit 5 *l* 0·2%iger Salzsäure versetzt, koliert, filtriert und mit 2·5 *g* Thymol versetzt wird. Dieser Magensaft bleibt lange wirksam (*Hecht* [2]).

Qualitativer Nachweis des Kaseins.

Für den Kaseinnachweis kommen nur Säuglings- und Kinderfäzes in Frage. Es wird dabei nach *Biedert* [3]) in folgender Weise verfahren: Die frischen Fäzes werden zunächst mit destilliertem Wasser und dünnem Salzwasser, sodann mit sehr verdünnter Salzsäurelösung ausgezogen. Darauf wird gewöhnliche Natronlauge zugesetzt und filtriert. Im Filtrat fällt durch Essigsäure ein starker Niederschlag aus. Was sich davon im Überschuß von Essigsäure löst, ist Kasein (Paranuklein).

Die quantitativen Methoden zum Nachweis des Kaseins sind alle höchst ungenau.

Biologische Differenzierung der Eiweißkörper im Fäzesextrakt.

In neuerer Zeit hat man versucht, den Nachweis der Abstammung des Fäzeseiweißes, ob Nahrungseiweiß oder Körpereiweiß, auf biologischem

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 55. 2. Aufl. Berlin 1905.

[2]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 66. Berlin und Wien 1910.

[3]) Zit. nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 134. 2. Aufl. Berlin 1905.

Wege zu erbringen. *Schloessmann*[1]) benutzte hierzu Menschen- und Hühnerantiserum vom Fällungsvermögen 1:25000. Die Reaktion wurde in den vom Nukleoproteid befreiten essigsauren Fäzesfiltraten angestellt, und zwar wurden 0·1 *cm*³ Immunserum auf 2 *cm*³ Fäzesextrakt zugesetzt. Die Präzipitinreaktion mit dem Menschenantiserum war immer prompt positiv.

Schloessmann bemerkt, daß man mit der praktischen Verwertung der Resultate dieser biologischen Eiweißproben in den Fäzes sehr vorsichtig sein muß. Nach *Hecht*[2]) hat es keinen Wert, im Stuhl auf biologischem Wege nach Nahrungseiweiß zu fahnden, denn *Hamburger* hat gefunden, daß das Eiweiß bereits im Magen seine Arteigenheit verliert.

Nachweis der Abbau- und Zersetzungsprodukte des Eiweißes und der Nukleinsäuren. Purinbasen und Harnsäure (Alloxurkörper).

Der Nachweis der Nukleine in den Fäzes und ihrer Abbauprodukte, der Purinbasen (Xanthin, Hypoxanthin, Guanin, Adenin und der Harnsäure) erfolgt nach *Krüger* und *Schittenhelm*[3, 4]) in folgender Weise: Die ganze frische Tagesmenge der Fäzes wird mit 1—2 *l* Wasser, dem 15 bis 20 *cm*³ konzentrierter H_2SO_4 zugesetzt sind, zirka 3 Stunden über freier Flamme am Rückflußkühler erhitzt. Diese Fäzesabkochung wird mit Natronlauge alkalisch und dann mit 10—20 *cm*³ Eisessig sauer gemacht und auf dem Wasserbad während kurzer Zeit erhitzt, wobei man 10 *g* Oxalsäure zusetzt, um den Kalk auszufällen. Nach dem Erkalten füllt man auf 1500—3000 *cm*³ auf und filtriert durch ein trockenes Faltenfilter. Ist der Niederschlag sehr massig, so muß man ihn mit heißem Wasser vom Filter spritzen, in einer essigsauren Lösung von Natriumazetat ausschwemmen, erwärmen, filtrieren und die Filtrate vereinigen. Ein Teil des Filtrats, etwa 500 *cm*³, wird in einem Kolben mit Natronlauge alkalisch gemacht, Natriumbisulfitlösung (auf 100 *cm*³ Filtrat 10 *cm*³) hinzugefügt und zum Kochen erhitzt. Dann fügt man ebensoviel 10%ige Kupfersulfatlösung hinzu und hält die Flüssigkeit noch durch einige Minuten im Sieden. Der entstehende flockige Niederschlag, der die Kupferoxydulverbindungen der Purinkörper (Harnsäure und Purinbasen) enthält, wird auf ein Faltenfilter gebracht, ausgewaschen und mit dem Filter in einen Fällungskolben zurückgebracht. Man fügt zirka 200 *cm*³ Wasser hinzu, schüttelt kräftig durch, erhitzt zum Sieden und fügt eine Na_2S-Lösung hinzu (die man durch Einleiten von H_2S in eine 1%ige Natronlauge hergestellt hat) so lange, bis

[1]) *H. Schloessmann*, Über Nachweis und Auftreten gelösten Eiweißes in den Fäzes Erwachsener. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. **60**. H. 3 und 4. 1906. S. 19 und 20 des Sep.-Abdr.

[2]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 70. Berlin und Wien 1910.

[3]) Zit. nach *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 47—48. Berlin und Wien 1910.

[4]) *A. Schittenhelm*, Die Purinkörper der Fäzes nebst Untersuchungen über die Purinbasen der Darmwand, der Galle und des Pankreassaftes. Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. **81**. H. 5 und 6. S. 427—429. 1904.

Bleiazetatpapier deutlich gebräunt wird. Man kocht noch einige Minuten, säuert mit 10%iger Essigsäure an und erhitzt noch weiter, bis das Schwefelkupfer sich zusammenballt. Tritt dies nicht ein und klärt sich die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit nicht genügend, so genügt stets die Zugabe von 5—10 *cm*³ gesättigter Aluminiumazetatlösung, um nach kurzem Aufkochen eine absolute Klärung zu erzielen. Der Niederschlag wird nun abfiltriert. Er muß jedoch, um Verluste zu vermeiden, nach dem ersten Abfiltrieren nochmals mit Wasser ausgekocht und abgesaugt werden. Die vereinigten Filtrate werden unter Zusatz von 10 *cm*³ 10%iger Salzsäure zur Trockne gebracht und der die Purinbasen enthaltende Trockenrückstand mit 5 *cm*³ Salzsäure und etwas Wasser in der Wärme versetzt. Nach dem Erkalten filtriert man von dem geringen Rückstande, der sich in braunen Flocken ausgeschieden hat, ab, wäscht mehrmals mit Wasser und kann nun die Purinbasen nach der Kupfer- oder Silberfällungsmethode bestimmen.

Kupferfällungsmethode: Man erhitzt das Filtrat zum Sieden, macht es mit Ammoniak schwach alkalisch, fügt 10 *cm*³ Natriumbisulfitlösung und 10 *cm*³ Kupfersulfat hinzu, erhält 3 Minuten im Sieden, filtriert durch ein Faltenfilter aus schwedischem Papier, wäscht mit heißem Wasser nach und bestimmt den Stickstoff nach *Kjeldahl*.

Silberfällungsmethode: Das Filtrat wird mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und mit 10 *cm*³ ammoniakalischer Silberlösung und 20 *cm*³ 10%igem NH_3 versetzt. Nun fügt man 10 *cm*³ 6%iger Dinatriumphosphatlösung und 5 *cm*³ einer Magnesiamischung hinzu, wodurch sich ein Niederschlag von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia bildet. Hierdurch wird das Absetzen des Niederschlages begünstigt und die Filtration des Silberniederschlages beschleunigt. Nach zweistündigem Stehen filtriert man den Niederschlag ab, wäscht ihn ammoniakfrei, spritzt ihn mit heißem Wasser in einen runden Kolben, vertreibt das Ammoniak durch Magnesia usta-Zusatz, kocht und bestimmt den Stickstoff der zurückbleibenden Silberverbindungen der Purinbasen nach *Kjeldahl*.

Der geringe bräunliche Filterrückstand enthält die etwa in den Fäzes enthaltene Harnsäure und dient zum Nachweis derselben (typische Kristalle, Murexidprobe). Ist das Vorhandensein von Harnsäure erwiesen, so kann die Menge derselben durch direkte Wägung oder durch Berechnung aus dem Stickstoffgehalt bestimmt werden.

Reindarstellung der Nukleinsubstanzen nach *Micko*.[1])

10 *g* pulverisierter Trockenkot werden mit 200 *cm*³ 2·5%igem Salzsäurealkohol 20 Stunden stehen gelassen, dann filtriert. Das salzsaure Filtrat enthält keine nennenswerten Mengen organisch gebundenen Phosphors. Der Filterrückstand wird mit 100 *cm*³ 2·5%igem Salzsäurealkohol,

[1]) Zit. nach *H. Ury*, Zur Methodik der Fäkaluntersuchungen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 41. S. 722. 1901.

sodann mit Alkohol bis zur Entfärbung des Filtrates gewaschen. Dann wird er mit 2·5%iger wässeriger Salzsäure nochmals gründlich extrahiert und bis zur Chlorfreiheit ausgewaschen. Der feuchte Rückstand wird in einem Meßkolben mit 100 *cm*³ 1%iger Sodalösung übergossen, aufs Volumen 250 *cm*³ gebracht, gut durchgeschüttelt, 20 Stunden stehen gelassen und dann filtriert. Von dem alkalischen Filtrate werden 75 *cm*³ mit 10 *cm*³ 2·5%iger HCl versetzt: Trübung durch Ausfall der Nukleinsubstanzen. Zusatz von weiteren 2 *cm*³ 2·5%iger HCl, sodann von 100 *cm*³ 96%igem Alkohol. Mäßig reichlicher flockiger Niederschlag. Filtration, Trocknung. Wägung.

Bestimmung des Nukleinphosphors.

Zur Bestimmung des Nukleinphosphors im Kote empfiehlt *Hecht*[1]) nach *Kossel* zu verfahren: 2—5 *g* fein gepulverten Kotes werden in einer Porzellanschale 3—4mal mit 100 *cm*³ Alkohol auf dem Wasserbade gekocht, vom Alkohol wird abfiltriert. Der Kot wird dann im Soxhletapparat mit Äther extrahiert und trocken mit 10—20 *cm*³ 20%iger Salzsäure verrieben. Hierauf werden bis 80 *cm*³ 20%iger Salzsäure und nach 12 bis 20 Stunden 15 *cm*³ 10%iger Tanninlösung zugefügt. Es wird umgerührt und durch ein aschefreies Filter abfiltriert. Sodann erfolgt Waschen des Rückstandes mit Salzsäure und tanninhaltigem Wasser, bis größere Filtratmengen keine P-Reaktion mehr geben. Nun wird das Filter getrocknet, mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und sodann die feuchte P-Bestimmung nach *Neumann* ausgeführt. Dazu werden 20 *cm*³ Kjeldahlschwefelsäure mit 15—20 *g* Ammoniumnitrat allmählich eingetragen. Dann wird mit molybdänsaurem Ammonium und Magnesiamixtur gefällt und aus der pyrophosphorsauren Magnesia der P berechnet.

Nach *Ury*[2]) läßt sich der Nukleinphosphor durch Extraktion der Fäzes mit ½%iger Natronlauge erhalten. Die Tagesmenge Kot wird mit ½%iger Natronlauge gründlich extrahiert, auf das Volumen 1000 *cm*³ gebracht und filtriert. 100 *cm*³ des Filtrats werden zur Sirupskonsistenz eingedickt, alsdann unter Zusatz von 20 *g* Salpetermischung geschmolzen, die Schmelze in Wasser gelöst und darin in der üblichen Weise der P bestimmt. Es läßt sich dabei allerdings nicht vermeiden, daß auch kleine Mengen anorganischen Phosphors mit ins Filtrat übergehen.

Indol, Skatol, Phenole, Oxysäuren.

Der qualitative Nachweis dieser Fäulnisprodukte wird in folgender Weise ausgeführt (zitiert nach *Ad. Schmidt*[3]):

[1]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 31—32. Berlin und Wien 1910.

[2]) *H. Ury*, Zur Methodik der Fäkaluntersuchungen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 41. S. 722. 1901.

[3]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. S. 143—144. 2. Aufl. Berlin 1905.

Die Fäzes werden mit Wasser zu dünnem Brei verrieben und der dritte Teil des Volumens abdestilliert. Dieses Destillat I enthält Indol, Skatol, Phenole und freie Fettsäuren. Destillat I wird mit Natriumkarbonat übersättigt und zum zweiten Male destilliert, wobei die Fettsäuren an Natrium gebunden zurückbleiben. Dieses neue Destillat II enthält Indol, Skatol und Phenole, wird mit Ätzkali stark alkalisch gemacht und wiederum destilliert, wobei die Phenole zurückbleiben. Das neue Destillat III enthält Indol und Skatol. Die im Destillat II zurückgebliebenen Phenole werden nach Ansäuern des Rückstandes mit Schwefelsäure abdestilliert und im Destillat IV nachgewiesen.

Der von der 1. Destillation zurückgebliebene Fäzesrückstand wird mit Schwefelsäure angesäuert, eventuell eingeengt und mit mehreren Portionen Äther ausgeschüttelt, das ätherische Extrakt wird abgedampft, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und darin mit *Millons* Reagens auf die Anwesenheit von Oxysäuren geprüft. Der Nachweis von Oxysäuren ist erbracht, wenn nach Zusatz von *Millons* Reagens unter Erwärmung Rotfärbung auftritt.

Nachweis der Phenole (Destillat IV): Rotfärbung oder roter Niederschlag beim Kochen mit *Millons* Reagens.

Violette bis blauschwarze Färbung einer vollkommen neutralen Lösung durch einige Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung.

Bromwasserzusatz gibt milchige Trübung und dann einen Niederschlag von gelbweißen seideglänzenden Nadeln oder Flocken von Tribromphenol.

Nachweis von Indol und Skatol im Destillat III.

Indol: Auf Zusatz einiger Tropfen Salpetersäure, die etwas salpetrige Säure enthält, Rotfärbung.

Auf Zusatz von Nitroprussidnatriumlösung und Natronlauge tiefe violettblaue Färbung, die auf Zusatz von Eisessig rein blau wird.

Ein mit starker Salzsäure befeuchteter Fichtenspahn wird durch alkoholische Indollösung kirschrot gefärbt.

Skatol: Auf Zusatz von salpetrige Säure enthaltender Salpetersäure weißliche Trübung.

Auf Zusatz von Nitroprussidnatriumlösung intensive Gelbfärbung, auf Zusatz von $^{1}/_{2}$ Volumen Eisessig nach Kochen allmählich eintretende Violettfärbung.

In konzentrierter Salzsäure löst sich Skatol mit Violettfärbung.

Quantitativer Indolnachweis.

In den Fäzes ist vorwiegend Indol vorhanden, weniger Skatol. Zum quantitativen (und auch qualitativen) Nachweis des Indols dient das *Ehrlich*sche Dimethylamidobenzaldehyd. Nach *Ad. Schmidt*[1]) und *Baum-*

[1]) *Ad. Schmidt*, Über den Nachweis und die Bestimmung des Indols in den Fäzes mittelst der *Ehrlich*schen Dimethylamidobenzaldehydreaktion. Münchener med. Wochenschrift. 1903. Nr. 17. S. 721—722.

stark[1]) gibt eine 5%ige alkoholische Lösung des *Ehrlich*schen Reagens unter Zusatz von konzentrierter Salzsäure mit Indollösungen eine rote, mit Skatollösungen eine blaue Färbung von außerordentlicher Intensität. Die Spektren der durch das Reagens gebildeten Farbstoffe sind charakteristisch: Das Indol zeigt einen Streifen zwischen *D* und *E*, bei *D* beginnend, das Skatol zwei Streifen, einen an Stelle des Indolstreifens und einen zweiten zwischen *C* und *D*. Skatol kann in den Fäzesextrakten nur an dem zweiten Streifen erkannt werden. Die Blaufärbung des Skatols schwindet bei der Reaktion vollständig gegenüber der Rotfärbung durch Indol.

Baumstark hat durch das Extinktionsverfahren festgestellt, daß 1 cm^3 einer Indollösung von 5 *mg* auf 1000 cm^3 absoluten Alkohol 3 cm^3 absoluten Alkohol zur Verdünnung braucht, um den Absorptionsstreifen gerade noch sichtbar zu lassen. Diese Testlösung benutzt *Baumstark*[2]) zu folgender schätzungsweise genauen quantitativen Bestimmung des Indolgehaltes der Fäzes:

Je nach der Konsistenz der Stühle werden 2·5—3 *g* oder bei flüssigen Stühlen 10 *g* Fäzes abgewogen und mit 40 cm^3 absolutem Alkohol so lange verrieben, bis keine gröberen Fäzespartikelchen mehr erkennbar sind. Nach kurzem Stehenlassen wird durch ein nasses Filter filtriert. Der Filterrückstand gibt nun keinen positiven Ausfall der Reaktion mehr, ein Beweis, daß alles Indol extrahiert ist. Zu 10 cm^3 des Filtrats werden 1 cm^3 *Ehrlich*sches Reagens und 1 cm^3 konzentrierte Salzsäure tropfenweise zugefügt und 10 Minuten lang tüchtig geschüttelt. Von dieser je nach Ausfall der Reaktion rosaroten bis dunkelroten Lösung wird 1 cm^3 so lange verdünnt, bis der Absorptionsstreifen gerade noch sichtbar ist (Taschenspektroskop). Alle Verdünnungen müssen in Reagenzgläschen von derselben Weite geschehen.

Je 1 cm^3 der oben erwähnten Testlösung und der zu untersuchenden Stuhlreaktion sind nun mittelst des Extinktionsverfahrens auf dieselbe Konzentration gebracht und können deshalb in einer Gleichung zusammengestellt werden. In derselben ist Menge und Indolgehalt der Testlösung und Menge der verdünnten Stuhlprobe bekannt.

Berechnung: Ist x = der gesuchten Indolmenge der zur Reaktion benutzten 10 cm^3 des Stuhlfiltrats und y = der Summe aus dem zur Verdünnung benutzten 1 cm^3 der Reaktion + der nötigen Verdünnungsflüssigkeit, so lautet die für jede Berechnung gültige Formel $x = 0{\cdot}000015 \times y$.

Diese Berechnung ergibt sich aus folgendem: In 1000 cm^3 der Testlösung ist 0·005 Indol enthalten, in 1 cm^3 demnach 0·000005 Indol.

Dieser eine Kubikzentimeter ist mit 3 cm^3 verdünnt, so daß die Menge von 0·000005 Indol in 4 cm^3 aufgelöst ist. Dies ist die Testlösung. In 1 cm^3 derselben ist dann $\frac{0{\cdot}000005}{4}$ Indol.

[1]) *R. Baumstark*, Bestimmungen der Fäulnisprodukte im Urin und in den Fäzes mit Benutzung der *Ehrlich*schen Aldehydreaktion. Münchener med. Wochenschr. 1903. Nr. 17. S. 722—723.

[2]) *R. Baumstark*, Verwertung der *Ehrlich*schen Dimethylamidobenzaldehydreaktion für eine quantitative Indolprobe in den Fäzes nebst Untersuchungen über die Eiweißfäulnis im Darme. Archiv für Verdauungskrankheiten. Bd. 9. H. 3. S. 204—205. 1903.

Ist nun x = der gesuchten Indolmenge der 10 *cm*³ Stuhlfiltrat, die zur Herstellung der Probe benutzt wurden, und y = der Menge der verdünnten Probe, in der 1 *cm*³ der 10 zur Reaktion benutzten Kubikzentimeter des Stuhlfiltrats enthalten ist, so lautet die Formel $x = \frac{0{\cdot}000005 \times 12 \times y}{4}$, und zwar 12mal, weil die Probe von 10 *cm*³, von der 1 *cm*³ verdünnt wurde, nach der Ausführung der Reaktion auf 12 *cm*³ angewachsen ist. Nach Ausrechnung der Division $\frac{12}{4}$ und der Multiplikation $0{\cdot}000005 \times 3$ resultiert die Formel $x = 0{\cdot}000015 \times y$.

Es erübrigt dann noch die weitere Ausrechnung des Indolgehaltes der täglichen Stuhlmenge.

Bei der Extraktion der Fäzes mit Alkohol geht Urobilin mit über. Der Absorptionsstreifen desselben stört bei der oben genannten Verdünnung nicht. Da das Urobilinogen (Hydrobilirubinogen) die gleiche Reaktion wie Indol gibt, so ist vor Anstellung der Probe darauf zu achten, daß dieser Körper entfernt wird. Das kann durch Überführung in Hydrobilirubin mittelst Jodtinktur oder Chlorzink oder durch Ausschütteln mit Petroläther geschehen (*Ad. Schmidt* [1]).

v. Moraczewski [2]) hält die quantitative Indolbestimmung mit Hilfe einer Nitroverbindung des Indols für exakter als die *Baumstark*sche Methode. Er verfährt folgendermaßen: 30—40 *g* Kot bei fester Konsistenz (entsprechend mehr bei flüssiger, jedoch nie mehr als 100 *g*) werden in einem 1500 *cm*³ fassenden Kolben mit 700 *cm*³ Wasser versetzt und daraus unter Anwendung eines Deflegmators für stark schäumende Flüssigkeiten 500 *cm*³ abdestilliert. Da die Fäzes meist schwach alkalisch reagieren, so ist kein Zusatz von Alkalien erforderlich. Ein Zusatz von Säuren führt zu Verlusten, obgleich das Kochen dabei entschieden ruhiger verläuft. Das Schäumen der Flüssigkeit kann durch sorgfältiges Überwachen der Flamme, besonders beim Beginn des Kochens, in Grenzen gehalten werden.

Von den 500 *cm*³ des Destillates werden nach gutem Umschütteln 150 *cm*³ genommen, mit 10 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure und 1 *g* Kieselguhr versetzt, kräftig geschüttelt und klar filtriert. In dem Filtrat erzeugen 2—8 Tropfen einer 2%igen Natriumnitritlösung eine Rosafärbung, welche nach 2—3 Stunden ihren Höhepunkt erreicht hat.

Die so gewonnene Lösung wird mit einer Stammlösung im Kolorimeter von *Wolff* [3]) verglichen. Die Stammlösung wird folgendermaßen bereitet: 1 *cm*³ 1%iger Indollösung (*Kahlbaum*-Berlin) wird in 500 *cm*³ Wasser genau gelöst, davon 5 *cm*³ abpipettiert und in einen Meßkolben mit zehn Tropfen Schwefelsäure und 2—5 Tropfen Natriumnitritlösung versetzt und auf 100 *cm*³ aufgefüllt. Jeder Kubikzentimeter enthält 0·000002 Indol. Mit der Stammlösung werden die 100 *cm*³ des Destillates verglichen und von

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger,* Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 145. Berlin 1905.

[2]) *W. v. Moraczewski,* Über den Mangel von Relation zwischen Harnindikan und Kotindol. Archiv für Verdauungskrankheiten. Bd. **14**. S. 375—381. 1908.

[3]) *G.* und *H. Krüss,* Spektralanalyse und Kolorimetrie. S. 17. Leipzig und Hamburg 1891.

der zu prüfenden Lösung so lange abgegossen, bis die Farbenintensität auf beiden Gesichtsfeldern gleich ist.

Leuzin und Tyrosin.[1, 2]

Diese Aminosäuren sind sowohl Produkte der fermentativen Eiweißverdauung als auch der bakteriellen Eiweißzersetzung. Sie erscheinen in den Fäzes nur unter pathologischen Verhältnissen.

Zum Nachweis stellt man ein alkoholisches Extrakt der vorher mit Äther entfetteten Fäzes her, filtriert, dampft ein und löst den Rückstand in kochendem Wasser. In dem Rückstande kristallisieren beim Eindampfen die Kristalle von Leuzin und Tyrosin aus.

Oder man kann den mit Wasser wieder aufgenommenen Rückstand des alkoholischen Extraktes mit Bleiazetat versetzen, das überschüssige Blei mit H_2S entfernen und bis zur Trockne eindampfen. Aus dem Rückstande wird mit heißem Alkohol das Leuzin und mit heißem Wasser das Tyrosin extrahiert.

Das Leuzin kristallisiert in den bekannten runden Kugeln und Knollen, zersetzt sich gegen 297° (korr.). Am einfachsten ist der Nachweis des Leuzins als Leuzinkupfer durch Zusatz einer kochenden Lösung von Kupferazetat zur kochenden wässerigen Leuzinlösung oder indem man eine konzentrierte Lösung von Leuzin und Kupferchlorid vorsichtig mit Barytwasser versetzt. Es fallen blaßblaue rhombische Tafeln aus, die im Wasser sehr schwer, in Methylalkohol unlöslich sind. Tyrosin kristallisiert in den bekannten Nadelbüschen. Es färbt sich, mit *Millons* Reagens erwärmt, rot. Erwärmt man etwas trockenes Tyrosin mit etwas konzentrierter H_2SO_4 in einem Uhrglase auf dem Wasserbade $^1/_2$ Stunde, verdünnt die erkaltete Lösung mit Wasser, neutralisiert mit Baryumkarbonat, filtriert und dampft ein, so enthält dann die Flüssigkeit Tyrosinsulfosäure und gibt auf Zusatz von etwas säurefreiem Eisenchlorid prachtvolle Violettfärbung.

Ammoniak.

Bei reichlicher Anwesenheit von Ammoniak in den Fäzes kann man unter Umständen schon durch den Geruch einer wässerigen leicht erwärmten Fäzesaufschwemmung und die Blaufärbung eines darüber gehaltenen roten Lackmuspapieres freies Ammoniak nachweisen.

Quantitative Bestimmung. Am geeignetsten ist die von *Krüger* und *Reich*[3]) angegebene Methode zur Bestimmung des Harnammoniaks.

[1]) *Ad. Schmidt*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 141—142. Berlin 1905.

[2]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 73—74. Berlin und Wien 1910.

[3]) *M. Krüger* und *O. Reich*, Zur Methodik der Bestimmung des Ammoniaks im Harne. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 39. H. 2. S. 165—182. 1903.

die von *Schittenhelm*[1]) für die Untersuchung der Fäzes modifiziert worden ist.

Krüger und *Reich*[2]) haben dazu folgenden Apparat angegeben: Ein ca. 1 *l* fassender Destillationsrundkolben ist mit einem doppelt durchbohrten Kautschukstopfen versehen. Die eine Bohrung geht in eine nach unten verengerte, in die Flüssigkeit tauchende Röhre, welche an ihrem äußeren rechtwinklig abgebogenen Ende mit einem dickwandigen Kautschukschlauch und Klemme versehen ist. Die andere Bohrung nimmt eine Überleitungsröhre auf, welche mit dem einen Schenkel einer dreikugligen *Péligot*schen Röhre verbunden ist. Die Péligotröhre dient als Vorlage und befindet sich in einem Gefäß mit Eiswasser. Der zweite Schenkel der Péligotröhre besitzt ebenfalls einen Kautschukstöpsel, durch dessen Bohrung ein kugel- oder birnenförmiger Destillieraufsatz (wie bei der *Kjeldahl*-Bestimmung) geht. Das freie Ende des Aufsatzes ist durch einen dickwandigen Gummischlauch, der durch Quetschhahn geschlossen werden kann, mit einer *Woulf*schen Flasche verbunden, deren zwei weitere Tuben einerseits mit einem Manometer, andrerseits mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung stehen. Der Destillationskolben taucht etwa bis zu $^1/_3$ in ein Wasserbad ein. Die Methode von *Krüger* und *Reich* beruht also auf dem Prinzip der Vakuumdestillation.

Die Bestimmung wird so ausgeführt[3]), daß zunächst die Péligotröhre mit 10—30 cm^3 $\frac{1}{10}$-Normalsalzsäure gefüllt wird, der man als Indikator einige Tropfen einer 1%igen alkoholischen Rosolsäurelösung zusetzt. Dann füllt man den Destillationskolben mit 25—50 cm^3 der aufs feinste mit $^1/_2$%iger Salzsäure verriebenen und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Fäzes und gibt im Destillationskolben ca. 10 *g* Natriumchlorid und darauf soviel Natriumkarbonat zu, bis deutliche alkalische Reaktion vorhanden ist. Hierzu genügt meist 1 *g*. Hierauf wird der Kolben ins Wasserbad gesetzt und mit der gefüllten Péligotröhre verbunden. An den zweiten Schenkel der Péligotröhre wird die Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Nun wird sofort so gut wie möglich evakuiert. Sobald das Vakuum den höchsten Grad erreicht hat, werden durch den am Kolben angebrachten Quetschhahn ca. 20 cm^3 Alkohol zugegeben und nun das Wasserbad auf eine Temperatur von ca. 43° gebracht. In der Folge gibt man von 10 zu 10 Minuten 15—20 cm^3 Alkohol auf dieselbe Weise zu, eventuell auch noch 10—15 cm^3 Wasser, falls die Flüssigkeit zu rasch eindampft. Zum Schlusse werden zur Verjagung der Wassertropfen in der Überleitungsröhre nochmals 10 cm^3 Alkohol zugegeben. Nach 30—40 Minuten ist die Bestimmung zu Ende geführt. Es wird nun durch den Quetschhahn die Wasserstrahlpumpe von der Péligotröhre abgeschlossen und darauf durch vorsichtiges Öffnen des am Destillationskolben angebrachten Quetschhahns die Luft langsam zum Einströmen gebracht. Die Temperatur des Wasserbades soll 43—44° nicht übersteigen. Danach spült man den Inhalt der Péligotröhre in ein Becherglas und titriert mit $\frac{1}{10}$-Normalnatronlauge zurück. Der Farben-

[1]) *A. Schittenhelm*, Zur Methodik der Ammoniakbestimmung. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. **39**. H. 1. S. 72—80. 1903.

[2]) *M. Krüger* und *O. Reich*, Zur Methodik der Bestimmung des Ammoniaks im Harne. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. **39**. H. 2. S. 170—171. 1903. (Abbildung.)

[3]) *A. Schittenhelm*, l. c. S. 76—78.

wechsel der Rosolsäure beim Übergange von saurer zu alkalischer Reaktion und umgekehrt ist sehr scharf, offenbar infolge der Anwesenheit von Alkohol.

Die Anzahl der zur Neutralisation des Ammoniak verbrauchten Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$-Normalsäure multipliziert mit 1·7 gibt die Menge von Ammoniak in Milligramm an, welche in der zur Destillation verwendeten Fäzesmenge enthalten war. Multiplikation mit 1·4 statt 1·7 gibt die Menge von Ammoniakstickstoff in Milligramm an.

Die Bakterienwägung nach Strasburger.

Zu den stickstoffhaltigen Fäzesbestandteilen gehören auch die Bakterien.

Das Prinzip der *Strasburger*schen [1]) Methode zur Feststellung der Bakterienmengen in den Fäzes ist folgendes: Verreibt man die Fäzes mit Wasser und zentrifugiert die Aufschwemmung, so sammeln sich die gröberen Teile am Boden an, die Bakterien bleiben dagegen, da sie annähernd dasselbe spezifische Gewicht wie die Flüssigkeit haben, suspendiert. Gießt man nun diese Flüssigkeit ab, macht sie durch reichlichen Zusatz von Alkohol leichter und zentrifugiert von neuem, so erhält man jetzt die Bakterien als Sediment. Die Bakterien werden getrocknet und gewogen. Geht man dabei von einer bestimmten Menge Material aus mit bekanntem Gehalt an Trockensubstanz, so kann man berechnen, wieviel Prozent der Trockensubstanz aus Bakterien bestehen bzw. wieviel von trockenen Bakterien an einem Tage mit den Fäzes entleert werden.

Die ursprüngliche *Strasburger*sche Methode ist von *Berger* und *Tsuchiya* [2]) und von *Ehrenpfordt* [3]) in einigen Punkten abgeändert worden, wodurch genauere Resultate erzielt werden.

Es wird daher die *Strasburger*sche Methode mit den Modifikationen der genannten Autoren zweckmäßig in folgender Weise ausgeführt:

Zur Untersuchung gelangt stets die ganze Stuhlmenge von 24 Stunden. Sofort nach der Entleerung kommen die Stühle in den Eisschrank und bleiben hier bis zum Beginne der sobald wie möglich vorgenommenen Untersuchung. Es ist wichtig, zur Untersuchung Stühle von möglichst gleichmäßiger Konsistenz zu verwenden, um ein exaktes Abmessen zu ermöglichen. Es werden daher die festen Stühle, nachdem sie gut durchgerührt und ihr Volumen in dem *Strasburger*schen Glase (Fig. 94, S. 332)

[1]) *J. Strasburger,* Untersuchungen über die Bakterienmenge in menschlichen Fäzes. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 46. H. 5 u. 6. S. 6—10 des Sep.-Abdr.

[2]) *Fr. Berger* und *J. Tsuchiya,* Untersuchungen über die Bakterienmenge der Fäzes unter normalen und pathologischen Verhältnissen und ihre Beeinflussung durch Calomel und Wasserstoffsuperoxyd. Zeitschr. f. exp. Pathologie u. Therapie. Bd. 7. H. 2. S. 438—440. 1910.

[3]) *M. Ehrenpfordt,* Kritik der *Strasburger*schen Wägungsmethode der Kotbakterien hinsichtlich ihrer absoluten Werte. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 7. H. 2. S. 455—466. 1910.

festgestellt worden ist, mit der Hälfte ihres Volumens, sehr harte Stühle mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und zu einer breiartigen Beschaffenheit verrieben. Das Volumen dünnbreiiger und flüssiger Stühle kann direkt in weiten Glasmeßzylindern gemessen werden. Auch sie werden sorgfältig verrieben, um eine gleichmäßige Verteilung aller Bestandteile zu erhalten. Ein kleiner für die Untersuchung speziell bestimmter Teil der so vorbereiteten Stuhlmasse wird nun in einem kleinen Porzellanmörser noch einmal aufs feinste verrieben. Von dieser Masse werden alsdann im Meßzylinder bestimmte Mengen, welche 2 *cm*³ der ursprünglichen Stühle entsprechen müssen (von normal konsistenten Stuhlgängen gewöhnlich 3 *cm*³; von Stühlen, die sehr hart waren und infolgedessen, wie oben erwähnt, mit dem gleichen Volumen Wasser verrieben wurden, 4 *cm*³; von dünnflüssigen Stühlen dagegen mehr, bis zu 10 *cm*³), abgemessen und zur Bestimmung der Trockensubstanz, eine zweite ebenso abgemessene Portion zur Bestimmung der Bakterienmenge verwendet. Zur Trockensubstanzbestimmung wird die abgewogene Kotmenge in einem Abdampfschälchen mit der gleichen oder doppelten Menge Alkohol verrührt, auf dem Wasserbade lufttrocken gemacht und im Trockenschrank oder Exsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die zur Bakterienwägung abgemessene Kotmenge, die also 2 *cm*³ des ursprünglichen Kotes enthält, wird nun mit 40 *cm*³ 0·5%iger HCl gut verrieben und mit geringer Kraft 5 Minuten lang mittelst elektrischer Zentrifuge bei 1500 Umdrehungen pro Minute ausgeschleudert. Die über dem Bodensatz befindliche trübe bakterienhaltige Flüssigkeit wird abgesaugt und in einen Meßzylinder gegossen, der Bodensatz erneut mit Salzsäurelösung verrieben resp. im Zentrifugenglas mit Salzsäure vermischt und ausgiebig durchgeschüttelt, wieder in derselben Weise wie oben zentrifugiert (5 Minuten, 1500 Umdrehungen) und dieses Verfahren etwa 5—6mal, selten noch ein 7. Mal wiederholt, bis die Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren fast klar ist. Um eine möglichst gute und gleichmäßig verteilte Bakterienaufschwemmung zu erhalten und das Zusammenbacken von Bakterienhäufchen tunlichst zu vermeiden, raten *Berger* und *Tsuchiya*, möglichst große Flüssigkeitsmengen zu verwenden, so daß am Schlusse der wiederholten Ausschleuderungen mindestens 200, meist sogar 250—300 *cm*³ salzsaurer bakterienhaltiger Flüssigkeit im Zylinder enthalten sind. Nun wird die ganze Flüssigkeit nochmals, und zwar kräftig (5 Minuten, 2000 Umdrehungen) in einzelnen Portionen ausgeschleudert. Der hierbei erhaltene, manchmal noch recht beträchtliche Bodensatz zeigt mikroskopisch neben sonstigen Fäzesbestandteilen noch ziemlich reichliche Bakterienhäufchen. Der Bodensatz wird deshalb nochmals mit Salzsäurelösung versetzt, durchgeschüttelt und ausgeschleudert (5 Minuten, 1500 Umdrehungen pro Minute). In dem nunmehr sich ergebenden Bodensatze sind kaum noch Bakterien nachzuweisen. Die gesamte Bakterienaufschwemmung wird jetzt mit 96%igem Alkohol in gleicher Menge versetzt, über 24 Stunden auf dem Wasserbade bei 40° C unter mehrmals erneutem Alkoholzusatz auf etwa 50 *cm*³ eingeengt, alsdann nochmals mit 96%igem Alkohol

versetzt und mit großer Geschwindigkeit 5 Minuten lang ausgeschleudert. Die nun den Bodensatz bildenden Bakterien werden schließlich mit absolutem Alkohol ausgewaschen. Hierauf wird mit Äther entfettet. Zu diesem Zwecke wird das Zentrifugenglas mit einem Gummikork verschlossen. *Strasburger*[1]) empfiehlt, da der Kork leicht abspringt und dadurch Verluste eintreten können, durchbohrte Gummikorke zu verwenden und das Loch des Pfropfens erst nach dem Aufsetzen mit einem Glasstabe zu verschließen (*Sato*[2]) rät, Korkpfropfen zum Verschluß zu nehmen, da der Äther den Gummi angreife). Die so verschlossenen Gläschen werden zur Entfettung 24 Stunden schräg hingelegt. Dann wird der Äther abgegossen, der Bodensatz mit Alkohol in ein gewogenes Schälchen gebracht, abgedampft, getrocknet und gewogen. Die Berechnung ist nach *Strasburger*[3]) folgende: Bekannt ist das Gewicht der Trockensubstanz (a) von 2 cm^3 frischem Kot und das Trockengewicht der Bakterien (b) in einer ebenso großen Portion. Wird der Prozentgehalt des trockenen Kotes an trockenen Bakterien mit x bezeichnet, so ist $x = \frac{100\,b}{a}$. Um die Gesamtmenge der Bakterien in 24 Stunden zu finden, wird das Volumen des frischen Tageskotes (c) (Durchschnitt aus 3 Tagen) bestimmt. Das Gewicht der trockenen, in einem Tage entleerten Bakterien ist dann $\frac{b}{2} . c$.

Ehrenpfordt[4]) empfiehlt, daß der Untersucher in allen Einzelbestimmungen peinlichst genau die obige Methodik einhält, besonders immer gleiche Ausschleuderungszeit und Umdrehungszahl beibehält, um vergleichbare Resultate zu erhalten. Eigentlich müßte nach *Ehrenpfordt* zunächst jeder Untersucher einige Normalstühle verarbeiten und seine übrigen Werte dann in Beziehung zu den gefundenen Normalwerten setzen, denn die Werte, die die einzelnen Autoren mit der nicht oder wenig modifizierten *Strasburger*schen Methode erzielt haben, gehen noch sehr auseinander.

Zum Absaugen der bakterienhaltigen salzsauren Flüssigkeit und zuletzt des Alkohols über dem Bodensatz hat *Strasburger*[5]) eine gut funktionierende Saugvorrichtung angegeben (Fig. 98).

Erforderlich sind zwei Spritzflaschen, deren Gummipfropfen jeder 3 Durchbohrungen aufweist. Durch das erste Loch geht ein Glasrohr bis beinahe auf den Grund eines jeden Gefäßes und ist außen schräg abgebogen. Das zweite Loch trägt ein kurzes Röhrchen. Durch einen Gummischlauch von etwa 25 *cm* Länge sind diese Röhrchen beider Flaschen miteinander verbunden. In einem Stativ ist die eine Flasche mit der Mündung nach unten befestigt, die andere Flasche steht unter ihr. Das dritte Loch

---

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 258. Anmerkung 3. Berlin 1905.

[2]) *Ts. Sato*, Über die Bestimmungen der Bakterienmenge in den Fäzes des Menschen. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 7. H. 2. S. 432. 1910.

[3]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, l. c. S. 258—259.

[4]) *M. Ehrenpfordt*, Kritik der *Strasburger*schen Wägungsmethoden der Kotbakterien hinsichtlich ihrer absoluten Werte. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 7. H. 2. S. 465. 1910.

[5]) *J. Strasburger*, Untersuchungen über die Bakterienmenge in den menschlichen Fäzes. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. 46. H. 5 und 6. S. 9 des Sep.-Abdr.

der oberen Flasche ist durch einen Glasstab verschlossen, das der unteren Flasche bleibt offen. Das obere Gefäß wird mit Wasser gefüllt. Öffnet man jetzt die bei *a* angebrachte Schlauchklemme, so läuft Wasser in das untere Gefäß, dessen Luft durch das offene Loch im Stopfen entweicht. Durch das Rohr *b* wird Luft eingesaugt. Dieses Rohr bringt man nun noch in Verbindung mit einem Gefäß, in welches die bakterienhaltige Flüssigkeit hineingesaugt werden soll. Letzteres trägt einen mit zugespitztem Glasrohre und Klemme versehenen Schlauch *c*. Bei Benutzung des Apparates wird erst die Klemme *a* geöffnet, dann das Röhrchen bei *c* zum Absaugen benutzt, wobei die dort befindliche Klemme eine genaue Regulierung der Geschwindigkeit erlaubt. Ist die obere Flasche leer gelaufen, so wird der Schlauch *b* abgenommen, an das entsprechende Rohr der unteren Flasche befestigt, desgleichen das Glasstäbchen, welches das dritte Loch im Pfropfen verschließt, ausgetauscht und man braucht nur noch die beiden Flaschen umzuwechseln, um von neuem ansaugen zu können.

Fig. 98.

Fig. 99.

Einfacher und ebenso zweckmäßig scheint die von *Sato* [1]) angegebene mit Gummiballon armierte Absaugpipette (Fig. 99) zu sein.

Um die Bakterien aus stark fetthaltigen Stühlen zu isolieren, setzt *Strasburger* [2]) der ersten Stuhlemulsion Alkohol und Äther zu gleichen Teilen zu und bringt dieses Gemisch, nachdem es gründlich verrieben worden ist, in das Zentrifugenglas. Beim Ausschleudern bilden sich drei Schichten, zu oberst die alkoholisch-ätherische Fettlösung, dann folgt die bakterienhaltige Mittelschicht und endlich ein Bodensatz. Die Mittelschicht wird abgesaugt; zu dem Rückstande kann man noch etwas Alkohol und Äther zusetzen, ihn verreiben und nochmals zentrifugieren, worauf man die gesamte alkoholisch-ätherische Fettlösung absaugt und weggießt. Der

[1]) *Ts. Sato*, Über die Bestimmungen der Bakterienmenge in den Fäzes des Menschen. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. B. 7. H. 2. S. 431. 1910.

[2]) *J. Strasburger*, Untersuchungen über die Bakterienmenge in den menschlichen Fäzes. Zeitschr. f. klin. Medizin. Bd. 46. H. 5 u. 6. S. 21 des Sep.-Abdr.

Bodensatz wird dann wie oben weiter verarbeitet. Die abgesaugte Mittelschicht muß natürlich den später abgegossenen bakterienhaltigen Flüssigkeiten zugefügt werden.

Gefärbte Bakterienpräparate.

Die Mikroorganismen müssen von den übrigen Kotbestandteilen getrennt werden. Hierzu wird ähnlich verfahren, wie bei der *Strasburger*schen Bakterienwägung. Man verreibt eine kleine Fäzesmenge, etwa von der Größe einer halben Erbse, mit einigen Kubikzentimetern Wasser, zentrifugiert und gießt dann vom Bodensatze die trübe Flüssigkeit ab, verdünnt einen Teil derselben mit 2 Teilen 96%igem Alkohol und zentrifugiert von neuem. Von dem jetzt erhaltenen bakterienhaltigen Bodensatze bringt man eine kleine Menge auf den Objektträger, läßt die Flüssigkeit ablaufen und verteilt die Bakterien in gleichmäßiger Schicht auf den Objektträger, indem man einen zweiten Objektträger aufdeckt und von dem ersten abzieht. Es entsteht so eine sehr feine gleichmäßige Schicht, welche über der Flamme fixiert wird. Zur Färbung kommen in Betracht *Löfflers* Methylenblau, zehnfach verdünnte wässerige Lösung von Karbolfuchsin, das *Ziehl*sche Karbolfuchsin zum Nachweise von Tuberkelbazillen, starke *Lugol*sche Lösung (Jod 1·0, Jodkali 2·0, Aqua dest. 50·0) zur Färbung granulosehaltiger Pilze.

Um ein Übersichtsbild über die Kotflora zu bekommen, eignet sich sehr gut die Färbung nach *Weigert-Escherich*[1]), eine modifizierte Gramfärbung. Hierzu benötigt man: Gentianaviolettlösung (2 *g* Gentianaviolett werden mit 200 cm^3 Aqua dest. eine halbe Stunde gekocht und filtriert; die Lösung ist lange haltbar); Anilinalkohol (11 cm^3 Alk. absol. werden mit 3 cm^3 Anilinöl gemischt); *Lugol*sche Lösung; Anilinölxylol zu gleichen Teilen; reines Xylol. Man mischt die Gentianaviolettlösung mit dem Anilinölalkohol im Verhältnis von $8^1/_2 : 1^1/_2$, färbt damit eine halbe Minute und tupft mit Fließpapier ab. Dann bringt man *Lugol*sche Lösung auf den Objektträger und tupft gleich wieder ab. Dann läßt man Anilinölxylol auftropfen und wieder abfließen so lange, bis keine blaue Farbe mehr abgegeben wird, spült zum Schluß einmal mit reinem Xylol ab und trocknet. Zur Nachfärbung dient schwache wässerige Fuchsinlösung oder eine mit gleichen Teilen Alkohol absolut. versetzte konzentrierte alkoholische Fuchsinlösung, die man über das Präparat laufen läßt und sofort mit reichlich Wasser abspült. Man sieht im Präparat blau und rot gefärbte Bakterien. Über die Deutung dieser Bilder vgl. *Strasburger*[2]) und *Combe*[3]).

Der Nachweis von Fett in den Fäzes.

Die Fette der menschlichen Fäzes sind in der Hauptsache die höheren unlöslichen Fettsäuren, d. h. Gemische von Öl-, Palmitin- und Stearinsäure und deren Salze (Fettseifen) und Glyzerinester (Neutralfette). Weniger für die menschlichen Fäzes kommen in Betracht die flüchtigen Fettsäuren und die fettähnlichen Körper (Lipoide: Cholestearin, Lezithin).

Makroskopischer, mikroskopischer und mikrochemischer Nachweis von Fett.

Jeder Stuhl enthält Fett. Bei abnorm großer Fettausscheidung ist das Fett im Kot makroskopisch oft ohne weiteres erkennbar (tonfarbiger Fett-

[1]) Zitiert nach *J. Strasburger*: *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 261. Berlin 1905.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 265—279.

[3]) *A. Combe*, Die intestinale Autointoxikation und ihre Behandlung. Übersetzt von *C. Wegele*. S. 145—147. Stuttgart 1909.

stuhl; flüssiges an der Luft erstarrendes Neutralfett). Geringere Grade von Fettstühlen erkennt man an der lehmartigen salbigen Konsistenz der Fäzes und der helleren Farbe. In seltenen Fällen (bei starken Diarrhöen) kommen nach *Ad. Schmidt*[1]) kleine weißgelbliche weiche Fettklümpchen vor, die im Mikroskop als Fett zu identifizieren sind.

Neutralfett erscheint im mikroskopischen Präparat in Form mattglänzender, unregelmäßig begrenzter Schollen und Platten und in Form von meist gelblich gefärbten Tropfen. Die Tropfen sind ohne weiteres als Neutralfett anzusprechen. Die Schollen können durch Erhitzen zum Schmelzen und Zusammenfließen gebracht werden und erstarren beim Abkühlen wieder zu undurchsichtigen Schollen. Das Neutralfett ist unlöslich in Wasser, wenig löslich in kaltem Alkohol, leicht löslich in Äther, Chloroform und heißem Alkohol. Mit Überosmiumsäure färbt sich Neutralfett gelbbraun bis schwarz, mit alkoholischer Lösung von Sudan III rot.

Die freien höheren Fettsäuren erscheinen im Stuhl zum Teil als unregelmäßige Schollen, die meist kleiner und kompakter sind als die Neutralfettschollen, oder in Form der bekannten langen, dünn geschwungenen, spitz auslaufenden, ungefärbten Fettsäurenadeln. Mikrochemisch unterscheiden sie sich vom Neutralfette dadurch, daß sie in kaltem Alkohol leicht löslich sind. Osmium und Sudan färben die Nadeln nicht, wohl aber die Schollen.

Seifen kommen ebenfalls als Schollen und als Kristalle vor. Die Schollen sind undurchsichtig, meist eckig begrenzt, größer und kleiner, leicht zerbrechlich, von kristallinischem Bruch. Zum Teil sind sie hellgelb bis gelbbraun gefärbt (*Nothnagels* gelbe Kalksalze = fettsaurer Kalk). Zum Teil sind die Kalkseifen ungefärbt, weiß. Eine andere Form der Seifen sind die von *Ad. Schmidt*[2]) beschriebenen „Kringelformen", „runde Gebilde mit erhabenem Rande und vertieftem Zentrum. Sie haben bei oberflächlicher Betrachtung große Ähnlichkeit mit Bandwurmeiern, die noch dadurch erhöht wird, daß der Rand manchmal eine feine radiäre Strichelung zeigt, auch im Zentrum findet sich bei einigen kristallinische Zeichnung. Sie sind nicht immer wohlausgebildet, sondern häufig zerbröckelt und kommen farblos oder gelb gefärbt vor".

Die Seifenkristalle sind ungefärbte Nadeln, die kürzer, plumper, dicker und weniger spitz sind als die Fettsäurenadeln und oft in Form von Drusen und Büscheln auftreten.

Die meisten der Schollen, Kringel und Nadeln sind Kalkseifen. Nachweis: Erwärmung des mit H_2SO_4 versetzten mikroskopischen Präparates. Die Seifen sind dann verschwunden; nach dem Erkalten treten Gipskristalle in Form feiner Spieße und langgezogener Rhomben auf.

Einfaches Erwärmen löst die Seifen nicht. Beim Erhitzen eines mit 30%iger Essigsäure innig vermischten Fäzespartikelchens auf dem Objekt-

[1]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. 2. Aufl. S. 16. Wiesbaden 1908.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 67. Berlin 1905.

träger bei aufgelegtem Deckglas schmelzen die Seifen zu Fettsäuretropfen, die mikroskopisch gut zu sehen sind und beim Erkalten rasch mit einem Ruck zu undurchsichtigen Schollen erstarren. Säuren, Alkalien und Ammoniak wirken auf die Seifen in der Kälte nicht ein. Ebensowenig wirken lösend heißes Wasser, Äther und Alkohol. Durch Osmiumsäure und Sudan findet keine Färbung statt.

Um alle 3 Formen des Fettes durch Färbung gleichzeitig differenzieren zu können, soll ein bei *Hecht*[1]) zitiertes, von *Jakobson* angegebenes Verfahren geeignet sein: Das Stuhlpräparat wird auf dem Objektträger mit einer verdünnten Karbolfuchsinlösung (4—5 Tropfen Karbolfuchsin auf ein Reagenzglas Aqua dest.) behandelt. Mit dieser Lösung färben sich die Neutralfetttröpfchen nicht, die Seifen färben sich rosa, die freien Fettsäuren aber leuchtend rot. Auf diese Weise gelingt es, Tröpfchen, die ätherlöslich sind und die Färbung mit Osmium annehmen, die man also für Neutralfett gehalten hätte, als freie Fettsäuren zu erkennen. *Jakobson* fand diese Reaktion besonders in pathologischen Säuglingskoten. *Hecht* hält die Reaktion nicht für beweisend zur Diagnose eines ausschließlich aus freier Säure bestehenden Tröpfchens.

Der chemische Nachweis des Fettes.

Der chemische Nachweis des Fettes ergibt sich zum Teil aus den vorstehenden mikrochemischen Reaktionen.

Ganz grob ist die Anwesenheit von Fett zu demonstrieren, wenn man die Fäzes mit Äther verreibt und einige Tropfen des abgehobenen Äthers auf Fließpapier verdunsten läßt; es hinterbleibt ein mit Wasser nicht zu entfernender Fettfleck. Ferner ist zum einfachen chemischen Nachweis des Fettes im Stuhl das oben beschriebene mikroskopische Essigsäurepräparat (Kochen mit Essigsäure) geeignet, in dem man nach dem Erhitzen die Fettsäuretröpfchen sehr schön sehen kann.

Bestimmung der Gesamtfettmenge als Gesamtätherextrakt.

Die Fette werden mit Äther im Soxhletapparat extrahiert. Um alles Fett zu bekommen, ist es nötig, vorher die mit Äther nicht extrahierbaren Seifen zu spalten. Dies geschieht folgendermaßen: Eine größere Quantität der in der früher geschilderten Weise lufttrocken gemachten pulverisierten Fäzes wird in einem Porzellanschälchen mit 1%igem HCl-Alkohol übergossen und verrührt und auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Hierbei ist öfter umzurühren und gut zu mischen, da sich bei sehr fetthaltigen Stühlen das Fett gern an der Oberfläche und an der Wand der Schale ansammelt. Darauf wird wieder pulverisiert und lufttrocken gemacht. Zur Extraktion werden Proben von 2—5 g des gespaltenen Kotes im Wiegegläschen abgewogen und in die zur Extraktion notige Papierpatrone gebracht. Extrahiert wird drei Tage lang mit wasserfreiem Äther

[1]) *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 119. Berlin und Wien 1910.

auf dem Wasserbade, welches zweckmäßiger Weise durch Glühlampen erwärmt wird. Das in dem untersten Kolben des Apparates angesammelte Ätherextrakt wird eingedampft, wieder mit Äther aufgenommen und in ein kleines gewogenes Becherglas filtriert, wobei das Filter sorgfältig mit Äther auszuwaschen ist. Das Filtrat wird eingedampft. Etwa im Glase noch vorhandene Ätherdämpfe werden durch Einblasen von Luft mittelst eines Glasrohres in das mit der Öffnung nach unten gehaltene Glas entfernt. Dann wird im Exsikkator über H_2SO_4 getrocknet und gewogen. Stets sind 1—2 Kontrollanalysen auszuführen.

Man erhält auf diese Weise das Gesamtätherextrakt.

Rosenfeld [1]) empfiehlt zur Bestimmung des Gesamtätherextraktes folgende kürzere Methode: Die wie oben mit HCl-Alkohol gespaltenen Fäzes werden in der Papierpatrone eine halbe Stunde lang in Alkohol in einem Becherglase auf dem Wasserbade ausgekocht. Nach Trocknen der Patrone wird sie oben zugebunden und 6 Stunden im Soxhletapparat mit Chloroform extrahiert. Alkoholextrakt und Chloroformextrakt werden jedes für sich zur Trockene eingedampft, mit Äther wieder aufgenommen, wie oben filtriert und die Filtrate vereinigt.

In dem Gesamtätherextrakt sind auch die flüchtigen Fettsäuren (deren Nachweis s. S. 386 und 387) und die Lipoide enthalten. Für die Zwecke der gewöhnlichen Fäzesanalyse sind diese geringfügigen Beimengungen unwesentlich. Wenn Wert darauf gelegt wird, diese Substanzen zu vermeiden, können sie entfernt werden.

Die Entfernung der flüchtigen Fettsäuren aus dem Gesamtätherextrakt geschieht durch Auswaschen des Extraktes mit heißem Wasser. Man gießt etwas heißes Wasser auf das trockene Extrakt, schwenkt öfters um und filtriert durch ein kleines glattes Filter, auf welchem etwaige von dem Wasser mit aufgenommene Fetttropfen zurückbleiben. Diese Prozedur wird häufig wiederholt. Hierauf werden das Bechergläschen mit dem Reste des Ätherextraktes und das Filter im Trockenschrank und Exsikkator getrocknet, das Fett des Filters mit Äther in das Becherglas mit dem Rest des Ätherextraktes zurückgespült. Dann wird eingedampft und wie oben getrocknet und gewogen.

Lipoide.

Die Entfernung des Cholestearins [2]) geschieht unter Benutzung der Tatsache, daß Cholestearin nicht verseifbar ist. Wenn also das Gesamtätherextrakt verseift und dann mit Äther extrahiert wird, so geht nur das Cholestearin in den Äther über. Die Ausführung ist so, daß das trockene Gesamtätherextrakt mit alkoholischer Normal-Kalilauge (auf etwa 1 *g* Extrakt zirka 20 *g* Lauge) zirka $^1/_2$ Stunde auf dem Wasserbade ge-

[1]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 151. Berlin 1905.

[2]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, l. c. S. 153.

kocht wird. Dann wird eingedampft und der Rückstand mit Äther ausgezogen. In dem ätherischen Auszuge ist das Cholestearin enthalten. Der Rückstand wird mit reichlich Wasser gelöst, mit verdünnter H_2SO_4 angesäuert. Die dadurch wieder gewonnenen Fettsäuren werden durch Schütteln mit Äther oder durch Filtration und Auswaschen des das Fett enthaltenden Filters mit Äther gewonnen.

Kossel[1]) empfiehlt folgendes Verfahren: Verseifung des in reichlich Äther wieder gelösten Gesamtätherextraktes mit einigen Kubikzentimetern Natriumalkoholat (durch Auflösen von 0·15 *g* Natrium in einer möglichst geringen Menge 99%igen Alkohols in der Wärme hergestellt). Umschütteln und dreistündiges Stehenlassen bei Zimmertemperatur. Abfiltrieren der Seifen, welche durch Waschen mit Äther vom Cholestearin befreit werden.

Beide Methoden haben den unvermeidlichen Übelstand, daß ganz kleine Mengen Seifen in den Ätherauszug des verseiften Fettes mit übergehen können.

Der qualitative Nachweis des Cholestearins in dem ätherischen Auszug des verseiften Gesamtätherextraktes geschieht so, daß der ätherische Auszug eingedampft und der Rückstand mit heißem Alkohol aufgenommen wird. Läßt man auf dem Objektträger einen Tropfen der alkoholischen Lösung verdampfen, so bleibt das Cholestearin in Form der bekannten rhombischen Tafeln, im Mikroskop gut sichtbar, zurück. Oder man versetzt eine Lösung des Cholestearins in Chloroform mit H_2SO_4; man erhält bei Anwesenheit von Cholestearin eine blutrote, später purpurrote Färbung.

Die quantitative Bestimmung des Cholestearins geschieht durch Eindampfen des ätherischen Auszuges aus dem verseiften Gesamtätherextrakt und Wägung des Rückstandes. Dabei ist zu bedenken, daß leicht etwas Seife mit in das Extrakt gegangen sein könnte. Um sie zu entfernen, behandelt man das eingetrocknete Cholestearinextrakt mit mehreren kleinen Portionen Alkohol und 1—2 Tropfen Salzsäure, wobei Cholestearin ungelöst bleibt, während die Seifen gelöst werden.

Neben dem Cholestearin kommt das ihm nahe verwandte Koprostearin vor. Dieses ist ebenso in Äther löslich wie Cholestearin, läßt sich nicht verseifen, wird also ebenso gewonnen wie Cholestearin. Es ist aber in heißem und kaltem Alkohol löslich und kristallisiert aus der alkoholischen Lösung in feinen langen biegsamen Nadeln aus. Chloroform-Koprostearinlösung, mit H_2SO_4 versetzt, bleibt anfangs gelb und wird erst nach längerem Stehen orange-purpurrot.

Bei der eben erwähnten Behandlung des Cholestearinrückstandes mit Alkohol und Salzsäure wird auch etwa vorhandenes Koprostearin gelöst.

Lezithin, eine Esterverbindung des Glyzerins mit zwei Gruppen Fettsäuren und Phosphorsäure, wobei die Phosphorsäure andererseits sich in Esterverbindung mit Cholin befindet, kommt in kleinen Mengen auch

[1]) Zitiert nach *A. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 153. Berlin 1905

in den Fäzes vor und geht mit in das Ätherextrakt über. Bei der Verseifung des Gesamtätherextraktes wird es gespalten. Sein Fettsäureanteil bleibt bei den Seifen. Sein Glyzerinphosphorsäureanteil geht bei der Entfernung der Cholalsäure (vgl. „Nachweis der Gallensäuren“, S. 389) als glyzerinphosphorsaurer Baryt mit ins Waschwasser über. Eventuell kann das Lezithin als ganzes bestimmt werden aus dem Phosphorgehalte des verseiften Gesamtätherextraktes, wobei *Hoppe-Seyler*[1]) folgendermaßen verfährt: Die wässerige, durch Äther vom Cholestearin befreite Seifenlösung wird mit einem Überschuß von Salpeter versetzt, in der Platinschale zur Trockne verdunstet, der Rückstand bis zur Entfernung der Kohle, aber nicht länger, geschmolzen, die Schmelze nach dem Erkalten in heißem Wasser gelöst, im Becherglase mit starker Salpetersäure unter Bedeckung des Glases stark sauer gemacht, einige Zeit im offenen Glase zur Entfernung der Untersalpetersäure auf dem Wasserbade digeriert, dann mit einer Lösung von molybdänsaurem Ammoniak in Salpetersäure gefällt und 12 Stunden stehen gelassen. Der hierauf abzufiltrierende, nicht weiter zu waschende Niederschlag von phosphormolybdänsaurem Ammoniak wird in verdünntem Ätzammoniak gelöst, die Lösung mit klarer ammoniakalischer Magnesialösung gefällt, 12 Stunden kalt stehen gelassen, der Niederschlag auf kleinem Filter gesammelt, mit verdünntem Ammoniak gewaschen, getrocknet, stark geglüht bis zur Entfernung der Kohle, im Exsikkator erkalten gelassen und gewogen. Man findet das Gewicht der pyrophosphorsauren Magnesia; dieses mit 7·27 multipliziert, ergibt das Lezithin des Ätherauszuges als Distearyllecithin.

Quantitative Bestimmung des Neutralfettes, der Seifen und Fettsäuren nach *Fr. Müller*.[2])

Zunächst werden die lufttrocken pulverisierten Fäzes, die ohne Schwefelsäurezusatz getrocknet sein müssen, mit Äther im Soxhletapparat extrahiert. Das hierbei gewonnene Extrakt enthält die Neutralfette und Fettsäuren. Die in der Patrone zurückgebliebene Substanz wird hierauf mit Salzsäurealkohol gespalten und nochmals mit Äther extrahiert. Dieses zweite Extrakt enthält die aus den Seifen abgespaltenen Fettsäuren. Aus dem ersten Extrakte werden die flüchtigen Fettsäuren, wie oben beschrieben, mit heißem Wasser entfernt, der Rückstand getrocknet, gewogen und nach erneuter Lösung in Ätheralkohol mit alkoholischer Kalilauge zur Bestimmung des Säuregrades titriert. Hierzu verwendet man eine alkoholische $\frac{1}{5}$-$\frac{1}{10}$-Normalkalilauge, als Indikator Phenolphtalein. *Fr. Müller* legte der Berechnung das Molekulargewicht der Stearinsäure zugrunde (1 cm^3 $\frac{1}{10}$-Normalkalilauge = 0·0284 Stearinsäure); es werden also die Anzahl der

[1]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 167. Berlin 1905.

[2]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, l. c. S. 153.

verbrauchten Kubikzentimeter $\frac{1}{10}$-Normalkalilauge mit 0·0284 multipliziert und das Produkt als Fettsäuren von dem Gewichte des Extraktes abgezogen. Der Rest entspricht dem Neutralfett (+ Cholesterin + Lezithin). Zur Entfernung des Cholesterins ist nach der Titration einzudampfen und wie oben mit alkoholischer Kalilauge vollends zu verseifen.

Nachweis der Kohlehydrate.

Stärke.

Stärke kommt in den Fäzes vor entweder in Form isolierter freier oder in Zellulosehüllen eingeschlossener Stärkekörner. Freie Stärkekörner finden sich bei gemischter Kost mit reichlicher Stärkebeigabe in geringer Zahl in jedem Stuhle, noch reichlicher, wenn die Stärke in Zellulosehüllen eingeschlossen genossen wird.

Mikrochemischer Nachweis.

Der Nachweis der Stärke in den Fäzes kann mikroskopisch so erfolgen, daß man nach *Ad. Schmidt*[1]) ein Fäzespartikelchen mit einem Tropfen starker *Lugol*scher Lösung (1·0 Jod, 2·0 Jodkali, 50·0 Aqua dest.) auf dem Objektträger mit Hilfe einer Präpariernadel innig vermischt, unter dem Deckglase in dünner Schicht ausbreitet und bei vollem Licht und schwacher Vergrößerung betrachtet. Man sieht dann die Stärkekörner wohl erhalten oder fragmentiert, tief dunkelblau gefärbt, frei oder in Zellulosehüllen eingeschlossen.

Fällt das Jodpräparat negativ aus, so ist damit noch nicht bewiesen, daß keine Stärke im Kote vorhanden ist. Es läßt sich dann mitunter chemisch Stärke nachweisen.

Chemischer Nachweis.

Der Nachweis von Stärke kann gelingen, wenn man den Kot mit Wasser aufkocht, filtriert, das Filtrat einengt und mit *Lugol*scher Lösung auf Blaufärbung fahndet.

Exakter wird der chemische Nachweis von Stärke so ausgeführt, daß die Stärke durch halbstündiges Kochen des pulverisierten trockenen Kotes mit 2%iger HCl am Rückflußkühler zu Zucker invertiert wird. Man neutralisiert bis zur schwachsauren Reaktion, filtriert etwa vorhandenes Eiweiß ab und prüft nach Trommer oder mit Phenylhydrazin. Nimmt man 10%ige HCl, so braucht man nur einige Minuten ohne Rückflußkühler zu kochen. Bei sehr geringen Zucker- respektive Stärkemengen, wo die Trommerprobe zuweilen versagt, empfiehlt *Strasburger*[2]) folgende Phenylhydrazinprobe:

Man gibt in ein Reagenzglas 5 Tropfen reines Phenylhydrazin, $^1/_2$ cm^3 Eisessig oder 1 cm^3 50%ige Essigsäure, 4 cm^3 der zu untersuchenden

[1]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. 2. Aufl. S. 18. Wiesbaden 1908.

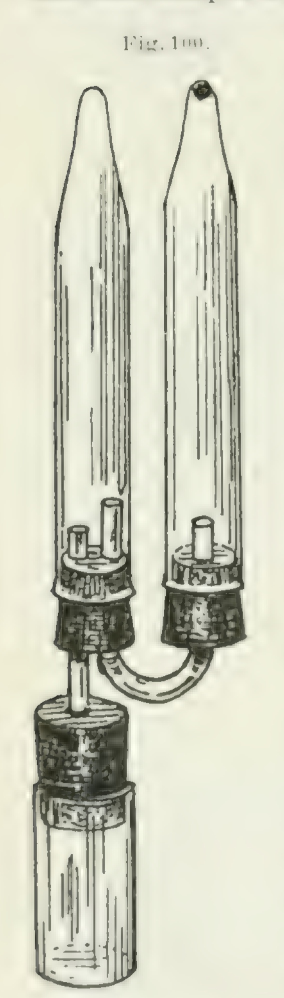
[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 173. Berlin 1905.

Flüssigkeit und kocht 1 Minute über kleiner Flamme. Dann setzt man 4—5 Tropfen Natronlauge vom spezifischen Gewichte 1·16 zu, so daß die Flüssigkeit sauer bleibt, kocht noch etwas und läßt erkalten. Man weist dann in der Flüssigkeit die Phenylglukosazonkristalle nach, deren Bildung in einigen Minuten bis zu einer halben Stunde erfolgt.

Nachweis der Stärke durch die *Ad. Schmidt*sche Gärungsprobe.[1, 2])

Die Probe bezweckt, etwa vorhandene Stärke im Kote bei Brutschranktemperatur zur Vergärung zu bringen. Sie zeigt nur die Stärke an, welche in einer für die Verdauungssäfte leicht angreifbaren Form mit den Fäzes ausgeschieden wird, d. h. also die freiliegende und eventuell die in dünne zarte Zellulosehüllen eingeschlossene Stärke. Diejenige Stärke, die von dickwandigen, für die Verdauungssäfte undurchdringlichen Zellwänden umschlossen ist, wird durch die Brutschrankprobe nicht gefunden. Die Brutschrankprobe bestimmt also im Gegensatz zu den sonstigen quantitativen Stärkebestimmungsmethoden nur die Stärke, welche eigentlich hätte verdaut werden müssen. Das Prinzip der Methode ist das der Nachverdauung. Die Stärke wird durch die im Kote vorhandene Diastase verzuckert und der Zucker durch die Darmbakterien unter Gasentwicklung zur Vergärung gebracht. Man berücksichtigt dabei nur die in den ersten 24 Stunden entstehenden Gasmengen.

Fig. 100.



Die Ausführung erfolgt mit Hilfe des von *Strasburger*[3]) angegebenen Gärungsröhrchens (Fig. 100): Von dem gut durchrührten Kote, dessen Reaktion geprüft ist, werden mittelst Holzspatels zirka 5 *g* abgeteilt, von harten Stühlen weniger, von dünnen Stühlen mehr, so daß stets annähernd dieselbe Menge Trockensubstanz verarbeitet wird. Das Gärungsröhrchen besteht aus einem Grundgefäß *a*, in welches der Kot hineingegeben und mit Wasser gut verrührt wird. Dann wird der Gummipfropfen mit dem leeren Röhrchen *c* unter Vermeidung von Luftblasen aufgesetzt. Das Röhrchen *c* trägt am oberen Ende eine kleine Öffnung. Das Röhrchen *b* wird bis zum Rande mit Wasser gefüllt und muß nun unter Vermeidung

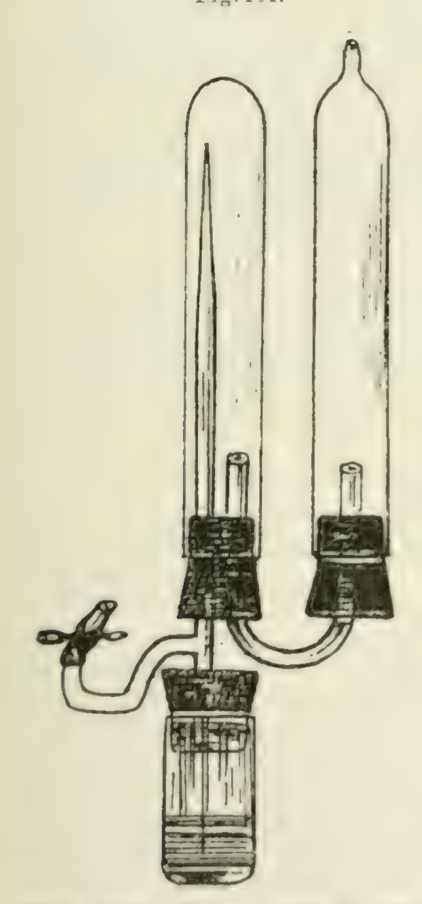
[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 178—180. Berlin 1905.

[2]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. 2. Aufl. S. 20—21. Wiesbaden 1908.

[3]) *J. Strasburger*, Experimentelle und klinische Untersuchungen über Funktionsprüfung des Darmes. III. Mitteilung. Die Grenzen physiologischer und pathologischer Nachgärung menschlicher Fäzes. Deutsches Archiv f. klin. Medizin. Bd. **61**. H. 5 und 6. S. 596. 1898.

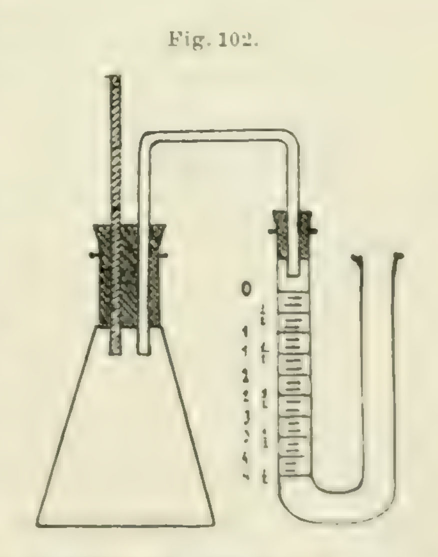
von Luftzutritt auf den mit dem Grundgefäße und dem Röhrchen *c* direkt in Verbindung stehenden doppelt durchbohrten Gummikork aufgesetzt werden. Man verfährt hierzu am besten so, daß man das mit Kot gefüllte Grundgefäß mit dem Röhrchen *c*, indem man es umgekehrt hält, auf das Röhrchen *b* aufsetzt. Dabei läßt sich das Einschließen von Luft vollständig vermeiden. Das fertige Präparat kommt für 24 Stunden bei 37° in den Brutschrank. Wenn sich Gas entwickelt, so tritt dieses aus dem Grundgefäß in das Röhrchen *b* ein und verdrängt das Wasser des Gläschens *b* nach dem Steigrohr *c*, in dem die Höhe des Wasserstandes nach 24 Stunden abgelesen werden kann. Kohlehydratgärung wird angenommen, wenn nach 24 Stunden etwa die Hälfte des Steigrohres mit Wasser gefüllt ist, wenn die Reaktion des Kotes deutlich sauer geworden ist, wenn der Kot im geöffneten Grundgefäß nach Buttersäure riecht und die Farbe des Kotes heller geworden ist.

Fig. 101.



Das *Strasburger*sche Gärungsröhrchen ist von einzelnen Autoren ohne zwingenden Grund modifiziert worden. Erwähnt sei hier das modifizierte Gärungsröhrchen von *Münzer*[1]), dessen Konstruktion aus der Fig. 101 zu ersehen ist. Das Verbindungsrohr zwischen *a* und *b* reicht hier bis an die Spitze von *b* hinauf und besitzt außerdem ein seitliches Ansatzrohr, welches mit Gummischlauch und Quetschhahn armiert ist. Das Rohr *c* trägt an Stelle seiner Öffnung einen kleinen offenen Zapfen. Diese Konstruktion des Röhrchens soll es ermöglichen, den Apparat ohne Luftbeimischung zusammenzusetzen. Erwähnt sei ferner eine Modifikation von *Amann*.[2]) Dieser Apparat (Fig. 102) besteht aus einem *Erlenmeyer*-Kolben mit flachem Boden von ungefähr 50 cm^3 Inhalt, dessen obere Öffnung mit einem doppelt durchbohrten Gummipfropfen verschlossen ist. Die eine Durchbohrung wird mit einem Glasstab verschlossen, während in die andere ein U-förmig gebogenes Glasrohr gesteckt ist, das die Verbindung zu einem zweiten U-förmigen Rohre herstellt, dessen linke Hälfte in Kubikzentimeter eingeteilt ist. Zur Ausführung der Untersuchung verreibt man zirka 1 *g* Fäzes mit 10 *g* Wasser in einer Reibeschale und gibt die Masse in den Glaskolben, setzt den Gummikork ohne den

Fig. 102.



[1]) *E. Münzer*, Ein neues Gärungsröhrchen zur Bestimmung der Stuhlgärung nach *Schmidt-Strasburger* nebst Beiträgen zur Stuhluntersuchung. Archiv f. Verdauungskrankh. Bd. 14. S. 25—33. 1908.

[2]) Zitiert nach *A. Combe*, Die intestinale Autointoxikation und ihre Behandlung. Übersetzt von *C. Wegele*. S. 149. Stuttgart 1909.

Glasstab auf, füllt das graduierte U-förmige Rohr zur Hälfte mit Wasser. Dann neigt man den ganzen Apparat, um die Luft zu entfernen und das Niveau des Wassers mit dem Nullpunkt der Einteilung in Übereinstimmung zu bringen, wobei der Glasstab als Kolben dient und entweder tiefer eingestoßen oder weiter herausgezogen wird, bis der Zweck erreicht ist. Danach bringt man den Apparat für 12 Stunden bei 37° in den Brutschrank. Dann läßt man auf Zimmertemperatur erkalten und kann die gebildete Gasmenge in Kubikzentimetern ablesen.

Quantitative Stärkebestimmung.

Zur quantitativen Bestimmung des Stärkegehaltes der menschlichen Fäzes ist am geeignetsten eine von *Strasburger*[1, 2]) revidierte und auch für die Bestimmung sehr kleiner Stärkemengen, wie sie in den menschlichen Fäzes häufig sind, als recht genau erkannte Methode, deren Prinzip darauf beruht, die Stärke in Dextrose zu invertieren, das der Dextrose entsprechende Kupferoxydul in schwefelsaures Kupfer überzuführen und dieses im Filtrat mit Hilfe der Kupfer-Rhodanürmethode von *Volhard-Pflüger* auszutitrieren. Die hierzu nötigen Reagentien sind folgende:

*Fehling*sche Lösung nach *Allihns* Vorschrift:
a) 34.639 *g* Kupfervitriol mit 5 Mol. Kristallwasser, mit Wasser auf 500 cm^3 gebracht.
b) 173 *g* Seignettesalz + 125 *g* KOH mit Wasser auf 500 cm^3 gebracht.

$\frac{1}{10}$-Normalsilberlösung.

$\frac{1}{10}$-Normal-Rhodanammoniumlösung.

Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1·2, der einige Harnstoffkristalle zugesetzt sind, um die salpetrige Säure zu vermeiden.

Konzentrierte Schwefelsäure.

Konzentrierte Sodalösung.

Kalt gesättigte wässerige Lösung von schwefliger Säure.

Kalt gesättigte wässerige Eisenammoniakalaunlösung.

An Meßgefäßen sind erforderlich 2 Büretten für die *Fehling*sche Lösung, je eine Bürette für die Rhodan- und Silberlösung, je ein geaichter Kolben von 50, 100, 200 und 300 cm^3 Inhalt.

Ausführung: Der lufttrockene Kot wird möglichst fein pulverisiert, um die Zellulosehüllen zu eröffnen. Ca. 2 *g* lufttrockener Kot werden genau abgewogen, in einem 300 cm^3 fassenden Kolben (*Liebermann*, *Erlenmeyer*) mit 100 cm^3 2%iger HCl versetzt und auf dem Sandbade $1\frac{1}{2}$ Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann wird mit Natronlauge nahezu neutralisiert und durch ein Asbestfilter (*Gooch*tiegel) mit Hilfe einer starken Saugpumpe filtriert, mit Wasser sorgfältig nachgewaschen und das Filtrat genau auf das Volumen von 200 cm^3 gebracht. Es ist zweckmäßig, wenn man vor dem Filtrieren den nach dem Kochen zurückgebliebenen Fäzesbodensatz gut absetzen läßt und die darüber stehende Flüssigkeit zunächst möglichst von dem Bodensatz getrennt auf das Filter gibt, so daß der Rückstand erst gegen Ende der Filtration ganz auf das Filter kommt. Es ist dies deshalb zweckmäßig, weil der Rückstand das Filter oft sehr stark verstopft,

[1]) *J. Strasburger*, Über den quantitativen Nachweis der leicht angreifbaren Kohlehydrate (Stärke und ihrer Abkömmlinge) in menschlichen Fäzes. Archiv f. d. ges. Physiol. Bd. 84. S. 173—190. 1901.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 174—177. Berlin 1905.

so daß das Filtrieren außerordentlich lange Zeit in Anspruch nimmt. Das auf 200 *cm*³ gebrachte Filtrat ist meist noch nicht ganz klar: deshalb filtriert man nochmals durch ein trockenes Faltenfilter. Von dem nunmehr klaren Filtrat werden 50 *cm*³ zur Zuckerbestimmung nach *Volhard-Pflüger* benutzt. Man bringt die 50 *cm*³ in ein etwa 300 *cm*³ fassendes Becherglas, in welchem sich 60 *cm*³ *Fehling*scher Lösung und 35 *cm*³ destilliertes Wasser befinden. Das Becherglas wird, mit einem Uhrglas oder mit einer Petrischale zugedeckt, in einen an einem Stativ befestigten Metallring eingehängt und in ein heftig siedendes Wasserbad so tief eingetaucht, daß das Wasser etwa 1 *cm* über dem Rande der Flüssigkeit steht. Das Wasserbad darf nicht aus dem Kochen kommen. Nach genau 30 Minuten ist das Glas herauszunehmen und zu der Flüssigkeit ca. 130 *cm*³ kaltes destilliertes Wasser zuzufügen. Darauf wird mittelst Saugpumpe durch ein Asbestfilterröhrchen, wie es von *Strasburger*[1]) angegeben ist, die Flüssigkeit abgesaugt, das Kupferoxydul, welches der Wand und dem Boden des Glases anhaftet, mit Hilfe destillierten Wassers und eines am Ende mit Gummi überzogenen Glasstabes in das Filterröhrchen gebracht und mit Wasser ausgewaschen. Dabei muß immer Flüssigkeit über dem Asbest stehen, damit kein Kupferoxydul mit durchgerissen werden kann. Statt des Filterröhrchens kann man nach meinen Erfahrungen auch sehr gut einen Porzellantiegel mit siebartig durchlöchertem Boden (*Gooch*tiegel), der genügend mit Asbest belegt ist, zum Absaugen benutzen, ohne Kupferoxydulverluste befürchten zu müssen. Nunmehr setzt man das Filterröhrchen oder den *Gooch*tiegel mit dem Kupferoxydul auf eine reine Saugflasche auf, löst das Oxydul in nicht zuviel Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1·2, wobei ein Uhrglas auf den Trichter gelegt wird, damit die beim Lösen aufschäumende Flüssigkeit nicht verspritzt. Man wartet nun, bis das salpetersaure Kupfer ohne Anwendung der Pumpe in die Flasche getropft ist und wäscht dann das Filter mit reichlich Wasser unter Anwendung der Pumpe aus. Die nunmehr grünlich gefärbte gesamte Flüssigkeit wird aus der Saugflasche in eine Porzellanschale ohne Verluste gebracht, mit $^1/_2$—1 *cm*³ konzentrierter Schwefelsäure versetzt und im Abzug auf dem Wasserbad abgedampft, bis alle Salpetersäure abgeraucht ist. Es bleiben Kristalle von schwefelsaurem Kupfer zurück, die in Wasser gelöst und in ein geaichtes 300 *cm*³-Kölbchen gespült werden. Dann fügt man zur Bindung der überschüssigen H_2SO_4 konzentrierte Sodalösung zu, bis eben ein bleibender Niederschlag entsteht. Dieser wird von 50 *cm*³ kaltgesättigter schwefliger Säure, die nun zugesetzt wird, wieder gelöst. Man kocht die Flüssigkeit auf und fügt sogleich aus der Bürette $\frac{1}{10}$-Normal-Rhodanammoniumlösung zu, bis die blaugrüne Farbe verschwunden ist. Es bildet sich bei Gegenwart von schwefliger Säure ein reichlicher Niederschlag von weißem Kupferrhodanür. Der Zeitpunkt des Verschwindens der grünen Farbe ist

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 175. Berlin 1905.

in der Flüssigkeit nicht immer leicht zu erkennen. Nach meinen Erfahrungen ist es zweckmäßig, bei Benutzung von 2 *g* menschlicher Fäzes etwa 50 cm^3 $\frac{1}{10}$-Normal-Rhodanammoniumlösung zuzusetzen, womit also Rhodanammonium im Überschuß zugesetzt ist. Das überschüssige Rhodanammonium muß mit $\frac{1}{10}$-Normallösung von salpetersaurem Silber zurücktitriert werden, um die Menge des zur Kupferrhodanürbildung verbrauchten Rhodans zu erfahren. Zu diesem Zwecke läßt man die Flüssigkeit erkalten, füllt bis zur Marke 300 mit Wasser auf und schüttelt energisch um. Nun filtriert man durch ein trockenes doppeltes Filter so lange, bis die Flüssigkeit wasserklar ist und mißt zur Titration 100 cm^3 in einem geaichten Kolben ab, bringt sie in ein Becherglas, setzt 50 cm^3 mit Harnstoff versetzter Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1·2 und 10 cm^3 einer kalt gesättigten Eisenammoniakalaunlösung zu, worauf die Flüssigkeit eine tiefrote Farbe annimmt. Dann läßt man so lange $\frac{1}{10}$-Normal-Silberlösung aus der Bürette zufließen, bis ein schwach gelb-rötlicher Farbenton das Ende der Titration anzeigt; oder man setzt etwas Silberlösung im Überschuß zu und titriert mit Rhodanlösung zurück, wobei sich die Endreaktion (Übergang in Gelbbraun) besonders gut markiert.

Da nur der dritte Teil der Flüssigkeit zur Titration mit der Silberlösung benutzt wird, so ist die Menge der verbrauchten Silberlösung mit 3 zu multiplizieren. Nach Abzug derselben von dem Volumen der angewendeten Rhodanlösung wissen wir, wieviel Rhodan an Kupfer gebunden ist. 1 cm^3 $\frac{1}{10}$-Normal-Rhodanammoniumlösung zeigt 6·32 *mg* Kupfer an. Der zugehörige Wert für Zucker ist in der folgenden von *Pflüger* aufgestellten Tabelle aufzusuchen.

Tabelle der zusammengehörigen Werte für Zucker und Kupfer (die Zahlen bedeuten Milligramme[1]).

Zucker	Kupfer	Zucker	Kupfer	Zucker	Kupfer
6·25	18·94	28	66·2	45	100·7
12	32·8	29	68·2	46	102·7
13	34·9	30	70·2	47	104·7
14	37·0	31	72·3	48	106·7
15	39·1	32	74·3	49	108·8
16	41·2	33	76·3	50	110·8
17	43·3	34	78·4	51	112·8
18	45·4	35	80·4	52	114·9
19	47·5	36	82·4	53	116·9
20	49·6	37	84·4	54	119·0
21	51·7	38	86·5	55	121·0
22	53·8	39	88·5	56	123·0
23	55·9	40	90·5	57	125·1
24	58·0	41	92·6	58	127·1
25	60·1	42	94·6	59	129·2
26	62·1	43	96·6	60	131·2
27	64·2	44	98·6		

[1]) Nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 176. Berlin 1905.

Die für Zucker gefundene Zahl ist mit dem von *Soxhlet* und *Lintner* und *Düll* gefundenen Faktor 0·94 zu multiplizieren, um den Wert für Stärke zu bekommen.

Die Methode ist trotz ihrer Feinheit, hinsichtlich deren sie andere Methoden übertrifft, nicht ganz fehlerfrei. Wie *Strasburger*[1]) gezeigt hat, wird mit der Methode immer etwas zu wenig Zucker (ca. 6 *mg*) gefunden. Weiter entstehen zuweilen Fehler, wenn es sich um die Bestimmung sehr kleiner Zuckermengen handelt. Es wird dabei, wie schon *Pflüger* zeigte, so wenig Kupferoxydul und in so feiner Staubform abgeschieden, daß es leicht durch das Asbestfilter mit hindurchgeht. Um diesen Übelstand zu vermeiden, empfiehlt *Pflüger*, wo es sich um sehr geringe Mengen Zucker handelt, ein bekanntes Quantum Zucker zuzufügen, welcher nachträglich bei der Berechnung in Abzug gebracht wird. Man kann sich zu diesem Zwecke eine mit 2·2%iger HCl versetzte und dadurch haltbar gemachte Traubenzuckerlösung von bekanntem Zuckergehalte vorrätig halten und mit einer Bürette abmessen. Die dabei verwendete Säure ist durch entsprechenden Alkalizusatz zu neutralisieren.

Weiterhin können unter Umständen Fehler entstehen, wenn der Stuhl pathologischerweise stark schleimhaltig ist, da Muzin beim Kochen einen reduzierenden Körper abspaltet. Man muß deshalb, wenn es sich um gröbere Schleimbeimengungen handelt, den Schleim mechanisch mit der Pinzette zu entfernen versuchen. Bei feineren Schleimbeimengungen, die sich mechanisch nicht entfernen lassen, empfiehlt *Strasburger*[2]) die Extraktion der Fäzes mit Kalkwasser. Doch führt auch diese nicht zum Ziele, da nach *Ad. Schmidt* der Darmschleim durch dünne alkalische Lösungen nur schwer gelöst wird. Hier läuft also eventuell ein kleiner Fehler mit unter.

Auch der Prozeß der Invertierung mit verdünnter Säure ist kein ganz einwandfreier. Es wird nämlich nicht alle Stärke in Zucker umgewandelt, sondern neben der Inversion findet eine geringfügige Reversion statt, welche einsetzt, wenn die Verzuckerung etwa bis zur Hälfte vorgeschritten ist. Die oben angegebene Kochzeit von $1^1/_2$ Stunden ist nach dem Vorgange *Allihns* von *Strasburger* beibehalten worden, weil es damit gelingt, ca. 95% der Stärke zu invertieren. Deshalb ist es auch richtiger, zur Berechnung der Stärkemenge die gefundene Zuckermenge mit 0·94 zu multiplizieren. Die Multiplikation mit 0·9, die sonst gebräuchlich ist, würde nur richtig sein, wenn man auf die Inversion sämtlicher Stärke rechnen könnte.

Fehler können bei der Inversion auch entstehen, wenn in den Fäzes sehr viele pflanzliche Reste (Gemüse usw.) enthalten sind. Die in den Pflanzen immer vorhandenen Hemizellulosen (Hexosane, Pentosane) werden beim Kochen mit dünnen Säuren ebenfalls in ihre Zucker (Hexosen, Pentosen) umgewandelt und würden daher die Zuckermenge zu groß machen. Für die menschlichen Fäzes dürfte dieser Umstand nur bei Personen, die reichlich Vegetabilien genießen, in Frage kommen. Die die Inversion begleitende Reversion scheint gerade bei Anwesenheit und Verzuckerung der Hemizellulosen noch mehr ins Gewicht zu fallen wie bei der Hydrolyse der Stärke, so daß man bei Einhaltung verschiedener Kochzeiten in den Kontrollanalysen Differenzen erhalten kann. Am geeignetsten sind daher zur Bestimmung der Stärke Kote, die von einer möglichst hemizellulosefreien Diät stammen. Auf jeden Fall ist es nötig, bei Anwendung der Methode die Kochzeit von $1^1/_2$ Stunden peinlichst einzuhalten.

Nötig ist es auch, ab und zu die *Fehling*sche Lösung auf etwaige Selbstreduktion zu prüfen.

Die gewichtsanalytischen Kupfermethoden (Reduktion des Oxyduls zu Kupfer nach *Allihn*, Wägung des Kupferoxyduls nach *Pflüger*) leiden an dem Fehler, daß bei

---

[1]) *J. Strasburger*, Über den quantitativen Nachweis der leicht angreifbaren Kohlehydrate (Stärke und ihrer Abkömmlinge) in menschlichen Fäzes. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. 84. S. 184. 1901.

[2]) *J. Strasburger*, l. c. S. 180.

ihnen Verunreinigungen, die mit dem Kupferoxydul aus den Fäzes niedergeschlagen werden, mitgewogen werden.

Zucker.

Die menschlichen Fäzes enthalten bei normaler Verdauung keinen Zucker. Bei schweren Störungen der Darmverdauung kann Zucker in geringen Mengen vorkommen.

Zum qualitativen Nachweis extrahiert man den Zucker mit Wasser, indem frische oder trockene pulverisierte Fäzes mit Wasser ausgekocht werden. Im Filtrat, welches am besten auf dem Wasserbade noch eingeengt wird, wird mit Hilfe der *Trommer*-, *Nylander*- oder Phenylhydrazinprobe auf Zucker untersucht. Diese Zuckerreaktionen können aber gestört werden, wenn gleichzeitig mit dem Zucker Albumosen oder Peptone extrahiert worden sind; diese Eiweißsubstanzen können unter Umständen Kupferlösungen reduzieren. Sicherer ist es daher nach *Uffelmann*[1]), den Kot mit Alkohol zu extrahieren, den filtrierten Alkohol zu verjagen, den Rückstand mit Wasser aufzunehmen und hierin die Zuckerprobe anzustellen. Nach *Blauberg*[2]) ist es zweckmäßig, ca. 3 *g* der Trockensubstanz mit Thymolwasser zu extrahieren, wobei die im Becherglas befindliche Substanz einige Stunden im Wasserbade leicht erwärmt wird. Nach Filtration und Nachwaschen mit Thymolwasser werden die Eiweißkörper durch Bleiazetat und basischessigsaures Blei abgeschieden. Der Überschuß des Bleis wird durch Einleiten von CO_2 und Abfiltrieren entfernt, das Filtrat abgedampft und auf Zucker untersucht.

Die *Schmidt*sche Gärungsprobe ist zum qualitativen Nachweis von Zucker dann geeignet, wenn die Nahrung völlig frei von Stärke und anderen leicht aufschließbaren Kohlehydraten war.

Zum quantitativen Nachweis ist es nötig, das mit Wasser oder nach *Uffelmann* oder *Blauberg* von einer gewogenen Fäzesmenge gewonnene Filtrat bis zu einem gewissen Quantum (200—300 *cm*³) aufzufüllen. Von dieser Zuckerlösung wird dann ein bestimmter Anteil (50—100 *cm*³) nach *Strasburger* mit *Fehling*scher Lösung gekocht und der Zucker mittelst der Kupferrhodanürmethode bestimmt. Diese Bestimmung mißlingt aber leicht dann, wenn der Zuckergehalt zu gering ist. *Strasburger* macht darauf aufmerksam, daß schon ein Zuckergehalt der Fäzestrockensubstanz von $^1/_2$%, der dem Nachweis von $1^1/_4$ *mg* Zucker und $2^1/_2$ *mg* Cu entsprechen würde, sich nicht mehr mit Sicherheit quantitativ bestimmen läßt.

Befreiung eines Fäzesextraktes von allen Kohlehydraten und von Eiweiß.

Um ein Fäzesextrakt mit Sicherheit von allen Kohlehydraten zu befreien, verfährt *Strasburger*[3]) in folgender Weise: Ca. 3 *g* der getrockneten fein pulverisierten

[1]) Zit. nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 169. Berlin 1905.

[2]) *M. Blauberg*, Experimentelle und kritische Studien über Säuglingsfäzes. S. 39. Berlin 1897.

[3]) *J. Strasburger*, Über den quantitativen Nachweis der leicht angreifbaren Kohlehydrate (Stärke und ihrer Abkömmlinge) in menschlichen Fäzes. Arch. f. d. ges. Phys. Bd. 84. S. 183. 1901.

Fäzes werden, um die Stärke zur Quellung zu bringen, mit 100 *cm*³ Wasser ½ Stunde am Rückflußkühler gekocht, dann mit Pankreasdiastase versetzt und einen Tag im Brutschrank gelassen. Dann läßt man die Flüssigkeit nach Zusatz von Bierhefe bei 22° C 2 Tage gären. Die Reaktion ist danach schwach sauer. Um alles Eiweiß zu entfernen, wird nach Zusatz von etwas Essigsäure gekocht und sorgfältig filtriert. Das Filtrat zeigt mit Kalilauge und Kupfersulfat keine Spur von Farbenreaktion.

Hemizellulosen.

Schon oben wurde erwähnt, daß bei der Hydrolyse der im Kot enthaltenen Stärke die erhaltene Dextrosemenge zu groß ausfallen kann, wenn Hemizellulosen im Kote vorhanden sind.

Der Name „Hemizellulose" stammt von *E. Schulze*[1]), der damit diejenigen Zellwandbestandteile bezeichnete, die weder zur Stärke noch zur Zellulose gehören und mit verdünnten Mineralsäuren hydrolysierbar sind. In den Pflanzen kommen vorwiegend vor Hexosane (Galaktan) und noch häufiger Pentosane (Araban, Xylan); ihre Zucker sind Galaktose, Arabinose und Xylose. Ist bei einer Stärkebestimmung im Kote damit zu rechnen, daß Hemizellulosen vorhanden sind und das Resultat stören könnten, so ist es nötig, sich von der Anwesenheit oder Abwesenheit dieser Substanzen zu überzeugen.

Pentosane. Zusatz einer kleinen Menge Phlorogluzin zu einer Probe des HCl-sauren zuckerhaltigen Filtrates der mit 2%igen HCl gekochten Fäzes und darauf folgendes Erwärmen gibt bei Anwesenheit von Pentosen kirschrote Färbung.

Ist die Probe positiv, so ist es nötig, durch quantitative Bestimmung der Pentosen das zu große Resultat der Stärkebestimmung nach *Strasburger* wenigstens annähernd richtig zu stellen. Benutzt wird das Verfahren von *Tollens*[2]), welches darauf beruht, daß die Pentosane und Pentosen bei Destillation mit HCl Furfurol geben: Die Destillation wird ausgeführt mit 2—5 *g* lufttrockenem Kot oder mit einem bestimmten Quantum der salzsauren Zuckerlösung. Es wird mit Salzsäure vom spezifischen Gewichte 1·06 destilliert, und zwar so, daß man stets, sobald 30 *cm*³ abdestilliert sind, 30 *cm*³ derselben Säure in den Destillationskolben nachgießt und im ganzen 400 *cm*³ überdestillieren läßt. Das dabei gebildete Furfurol wird im Destillat durch Phlorogluzin ausgefällt. Den Niederschlag, das Furfurolphlorogluzid, sammelt man in mit Asbest beschickten Porzellan-*Gooch*-Tiegeln und wäscht ihn mit 150 *cm*³ Wasser aus. Die Tiegel werden dann 4 Stunden im Wassertrockenschranke bei 97—98° C getrocknet, in Wiegegläser, welche sofort verschlossen werden, gegeben, in diesen in den Exsikkator gebracht und nach dem Erkalten im Exsikkator mit den Wiegegläsern gewogen. Auf diese Weise vermeidet man Papierfilter und den Einfluß der hygroskopischen Eigenschaften des Phlorogluzids, und die Resultate werden sicherer und konstanter als es früher möglich war. Für Phlorogluzidmengen von 30—300 *mg* kann man die entspre-

[1]) *E. Schulze*, Zur Chemie der pflanzlichen Zellmembranen. II. Abhandlung. Zeitschrift f. phys. Chem. Bd. 39. 1903.

[2]) *B. Tollens*, Über die Bestimmung der Pentosen und Pentosane Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 36. S. 239—243. 1902.

chenden Werte an Furfurol, Arabinose, Araban, Xylose, Xylan, Pentose und Pentosan aus einer bei *Tollens*[1]) mitgeteilten ausführlichen Tabelle, welche von *Kröber* stammt, ablesen.

Die Zahlen für Pentose und Pentosan sind in dieser Tabelle die Mittelzahlen aus Arabinose und Xylose und Araban und Xylan, die man anwendet, wenn man mit Gemengen von Arabinose und Xylose zu tun hat oder wenn man nicht weiß, welche Pentose in der untersuchten Substanz sich befindet.

Ebendaselbst finden sich auch Formeln zur Berechnung von Furfurol, Pentosan und Pentose, wenn das Phlorogluzid weniger als 30 *mg* oder mehr als 300 *mg* wiegt.

Es darf nicht übersehen werden, daß den Pentosen- und Pentosanbestimmungen noch immer zahlreiche Mängel anhaften, die ihre Genauigkeit beeinträchtigen. Sie gehören in die Reihe der konventionellen Methoden, bei denen es auf peinlichstes Innehalten der Bedingungen sehr ankommt.

Hexosane. Der Nachweis des Galaktans würde so zu führen sein, daß das HCl-saure zuckerhaltige Filtrat der Fäzes eingedampft und der syrupöse Rückstand mit Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1·15 auf dem Wasserbade erwärmt wird. Bei Anwesenheit von Galaktose entsteht Schleimsäure.

Im allgemeinen kommen, wie gesagt, die Bestimmungen im menschlichen Kote kaum in Frage.

Will man speziell die Ausnutzung einer Hemizellulose im menschlichen Darme feststellen, so ist darauf zu achten, daß außer der Hemizellulose weder Zucker noch Stärke in der Versuchszeit genommen werden. Es genügt dann, im Fütterungsmaterial und im Kote den Zuckergehalt nach *Strasburger* festzustellen und miteinander zu vergleichen, wie ich[2]) dies bei Versuchen über die Ausnutzung der Hemizellulose des Agars getan habe. Um vergleichbare Resultate zu erhalten, ist bei jeder einzelnen Untersuchung peinlichst genau nach den *Strasburger*schen Vorschriften (Kochzeit!) zu verfahren.

Nachweis der Rohfaser und Zellulose.

Unter Rohfaser versteht man alles das, das nach Behandlung von Pflanzenteilen mit Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien, Alkohol und Äther ungelöst zurückbleibt. Der Hauptanteil der Rohfaser besteht aus Zellulose, daneben sind noch enthalten Lignin, Kutin und Aschenbestandteile, welche mit zunehmendem Alter der Pflanze die ursprünglich reine Zellulose innig durchdringen und inkrustieren.

Die Zellulose gehört nach der heutigen Auffassung zu den Polysacchariden, und zwar ist sie ein Anhydrid der Dextrose von der Formel n $(C_6H_{10}O_5)$.

[1]) *B. Tollens*, Über die Bestimmung der Pentosen und Pentosane. Zeitschrift f. phys. Chemie. Bd. **36**. S. 239—243. 1902. Die Tabelle (Tabelle zur Umwandlung von Phlorogluzid in Furfurol, Pentosan usw. von *E. Kröber*) befindet sich am Ende des Bandes.

[2]) *H. Lohrisch*, Der Vorgang der Zellulose- und Hemizellulosenverdauung beim Menschen und der Nährwert dieser Substanzen für den menschlichen Organismus. Zeitschrift f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 5. S. 14—16 des Separatabdruckes. 1908. (Daselbst ausführliche Literatur über Hemizellulosen.)

Makroskopischer, mikroskopischer und mikrochemischer Nachweis.

Abgesehen von sehr groben Pflanzenresten, die ohne weiteres in die Augen fallen, kann man sich einen makroskopischen Einblick in den Gehalt der Fäzes an pflanzlichen Bestandteilen nur verschaffen, wenn man eine größere gut durchmischte Fäzesmenge nach *Ad. Schmidt* aufs feinste mit Wasser verreibt und auf dem Makroskopierteller ausbreitet. Man sieht dann die gelblich-bräunlich oder grünlich gefärbten Zellulosereste, die sich schon durch ihre harte Beschaffenheit als pflanzliche Gebilde ausweisen.

In zweifelhaften Fällen ist mikroskopisch zu untersuchen. Jeder Stuhl, der von einer Vegetabilien enthaltenden Kost stammt, enthält mikroskopisch sichtbare Partikel von Rohfaser und Zellulose, die in den verschiedensten Formen auftreten können (Parenchymzellen, verholzte und unverholzte Membranen, Epidermis, spiralige Gefäße, Pflanzenhaare, bräunliche Spelzenreste, Kakaoreste, Bruchstücke der Kleberzellenschicht, Cotyledonen, Kartoffelzellen, Steinzellen aus Birnen u. v. a.). Gute Abbildungen hierzu sind bei *Schmidt* und *Strasburger*[1]) einzusehen.

Mikrochemisch wird Zellulose nachgewiesen durch ihre Eigenschaft, sich mit Jodchlorzinklösung violett zu färben. Die Färbung beruht darauf, daß die Zellulose durch Jodchlorzink in einen amyloidartigen Körper überführt wird.

Dabei ist immer zu bedenken, daß es natürlich nur die reine, nicht mit inkrustierenden Substanzen (Lignin, Kutin) durchsetzte Zellulose ist, die diese Reaktion deutlich gibt. Verholzte und verkorkte Zellulose (= Rohfaser) gibt die Reaktion nicht oder nur undeutlich, weil die inkrustierenden Substanzen dem Reagens das Eindringen in die Zellulose sehr erschweren. Finden sich also reinviolett gefärbte Teilchen, so sind diese als Reinzellulose anzusehen. Reine Zellulose ist, wie ich[2, 3]) nachwies, für den Menschen verdaulich, wahrscheinlich durch eine Zytase. Verdaut werden vom normalen Darm ca. 60% der eingeführten Zellulose. Immerhin setzt die Zellulose den Verdauungssäften einen viel größeren Widerstand entgegen, als die sonstigen Nahrungsbestandteile, woraus sich der relativ große Teil unverdauter, an sich aber verdaulicher Zellulose in den Fäzes erklärt. Ein gewisser Anteil der Zellulose unterliegt im Darm einer bakteriellen Zersetzung, wobei Essigsäure, Buttersäure, Wasserstoff und CH_4 gebildet werden. Die rein violett gefärbten Partikel im Kot stellen also immer verdauliche Zellulose dar, weil eben reine Zellulose an sich verdaulich ist. Zellulose, die mit Holz- und Kutinstoffen, den inkrustierenden Substanzen, verunreinigt ist, also Rohfaser, färbt sich mit Jodchlorzink gelblich-bräunlich oder gar nicht. Derartige Rohfaserteilchen sind natürlich unverdaulich. *Amann*[4]) unterscheidet neuerdings verdauliche und unverdauliche

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. Taf. VI und VII. Berlin 1905.

[2]) *H. Lohrisch*, Über die Bedeutung der Zellulose im Haushalte des Menschen. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 47. H. 2 und 3. S. 200—252. 1906 (Literatur)

[3]) *H. Lohrisch*, Der Vorgang der Zellulose- und Hemizellulosenverdauung beim Menschen und der Nährwert dieser Substanzen für den menschlichen Organismus. Zeitschrift f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 5. 1908.

[4]) *J. Amann*, La recherche microchimique de la cellulose digérable dans les matières fécales. Revue médicale de la Suisse Romande. XXXme Année. Nr. 2. 20 février 1909. Sep.-Abdr.

Zellulose. Mit letzterer bezeichnet er die gelblich gefärbten unverdaulichen Rohfaserteilchen. Das ist nach dem Vorstehenden insofern zu beanstanden, als hierbei der prinzipielle Unterschied, der zwischen Rohfaser und Zellulose besteht, nicht genügend betont wird. Man sollte doch, worin es besonders die ältere Literatur sehr fehlen läßt, stets scharf zwischen Rohfaser und Zellulose unterscheiden. Wenn man dies tut, kann man auch nicht von verdaulicher und unverdaulicher Zellulose reden, denn es gibt eigentlich keine unverdauliche Reinzellulose.

Um die Jodchlorzinkreaktion recht deutlich zu bekommen, ist es zweckmäßig, das Reagens nicht zu konzentriert zu nehmen, worauf auch *Amann*[1]) hinweist und folgende Zusammensetzung vorschlägt: Reines Zinkchlorid 10·0, Jodkali 2·5, Jod 0·25, Aqua dest. 10·0. Zur Technik empfiehlt er Zentrifugieren des mit Wasser verriebenen Kotes und Untersuchung des Sediments, von dem ein Tropfen auf dem Objektträger mit einem Tropfen der obigen Lösung vermischt wird.

Die Zellulose färbt sich ferner blau, wenn man einem vorher mit *Lugol*scher Lösung vermischten Präparat Schwefelsäure ($2\,H_2SO_4 : 1\,H_2O$) oder Phosphorsäure zufließen läßt. Ferner wird Zellulose durch frisch bereitete Kupferoxydammoniaklösung gelöst.

Lignin färbt sich nach Vorbehandlung mit Phlorogluzinalkohol in Salzsäure violett rot.

Kutin nimmt bei Zusatz von Kalilauge einen gelben Farbenton an (*Ad. Schmidt*[2]).

Der quantitative Nachweis der Rohfaser und Zellulose.

Rohfaser.

Die Rohfaser ist ihrer Zusammensetzung nach naturgemäß chemisch niemals exakt zu definieren, sondern ist je nach Art und Alter der Pflanzen ganz verschieden zusammengesetzt. Deshalb liefern auch die gebräuchlichen Methoden zur Darstellung der Rohfaser niemals ein gleichmäßig zusammengesetztes Produkt, sondern die erhaltene Rohfaser wird stets nach der Beschaffenheit des pflanzlichen Materials und der Art der angewendeten chemischen Agentien eine andere Zusammensetzung haben. Darum ist es auch schwierig, bei quantitativen Rohfaserbestimmungen in den Kontrollanalysen genau übereinstimmende Resultate zu erhalten. Häufig ist eine größere Anzahl Analysen nötig, um brauchbare Resultate zu erzielen. Es sei daher gleich von vornherein darauf hingewiesen, daß es bei den Rohfaserbestimmungen dringend nötig ist, bei der Verarbeitung eines bestimmten Materials bei den erforderlichen mehrfachen Analysen peinlichst darauf zu achten, daß in bezug auf Kochzeiten, Zusammensetzung der Reagentien, Hitzegrade usw. ganz gleichmäßige Verhältnissse herrschen.

Zur Ausführung der quantitativen Rohfaserbestimmung benutzt man am besten das alte *Weender* Verfahren von *Henneberg* und *Stohmann*[3]) mit einigen von *Wattenberg*[3]) und *v. Knieriem*[3]) angegebenen Verbesserungen. Dasselbe wird folgendermaßen ausgeführt:

[1]) *J. Amann*, La recherche microchimique de la cellulose digérable dans les matières fécales. Revue médicale de la Suisse Romande. XXXme Année. Nr. 2. 20 février 1909. S. 4 des Sep.-Abdr.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 78. Berlin 1905.

[3]) Literatur vgl. bei *H. Lohrisch*, Über die Bedeutung der Zellulose im Haushalte des Menschen. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 47. H. 2 und 3. S. 203—207. 1906.

Ca. 3 *g* lufttrockene pulverisierte Fäzes (sehr fettreiche werden vorher mit Äther extrahiert) werden mit 50 *cm*³ 5%iger Schwefelsäure und 150 *cm*³ Wasser unter Ersatz des verdampfenden Wassers 1/2 Stunde lang in einer Porzellanschale gekocht, zum Absetzen stehen gelassen, die Flüssigkeit mit einem kleinen Glasheber abgehoben, der Rückstand zweimal mit Wasser ausgekocht, die jedesmal abgehobene Flüssigkeit mit der ersten vereinigt. Der Rückstand wird danach ganz in derselben Weise mit einer Mischung von 50 *cm*³ 5%iger Kalilauge und 150 *cm*³ Wasser, dann mit Wasser behandelt und zuletzt auf ein gewogenes Filter gebracht. Die kalihaltige Flüssigkeit wird soweit als möglich mit dem Heber abgehoben, der Absatz mit dem Inhalt des Filters vereinigt, letzteres bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion ausgewaschen, dann das Sediment aus den schwefelsäurehaltigen Flüssigkeiten darauf gegeben, darauf sukzessive mit Wasser, Alkohol und Äther vollständig ausgewaschen, getrocknet und gewogen. Der Wert für Asche und Proteinsubstanz ($N \times 6·25$) wird von der Rohfaser in Abzug gebracht.

Der Nachteil des Verfahrens liegt in der viel zu langen Dauer, da man gezwungen ist, vor dem Abhebern zu warten, bis Sedimentierung eingetreten ist, was oft lange Zeit in Anspruch nimmt. *Wattenberg* hat daher vorgeschlagen, sich statt des lästigen Abheberns eines mit Gaze und Fließpapier überzogenen Trichters, der mit einem Saugapparat in Verbindung steht, zu bedienen. Auf diese Weise kann man die sauren und alkalischen Flüssigkeiten schnell und so vollständig von dem Rückstande absaugen, daß kaum einige Kubikzentimeter bleiben. Es empfiehlt sich dabei, die gekochten Flüssigkeiten möglichst heiß abzusaugen. Vorteilhaft ist es auch, zum Kochen Porzellanschalen zu benutzen, welchen nach *Wattenberg* genau im Niveau von 200 *cm*³ unter der Glasur ein blauer Ring eingebrannt ist. Dadurch läßt sich der Flüssigkeitsstand während des Kochens durch Nachfüllen bis zum Ring stets regulieren. *v. Knierim* empfiehlt als wesentlich zeitsparend die Anwendung der Zentrifuge zum Absetzen der Rückstände.

Ein neueres Verfahren, welches bessere Resultate geben soll, ist das Glyzerin-Schwefelsäureverfahren von *König*[1]):

3 *g* lufttrockene pulverisierte Fäzes werden mit 200 *g* Glyzerin vom spezifischen Gewichte 1·23, welches 20 *g* konzentrierte Schwefelsäure im Liter enthält, bei 133—137° 1 Stunde am Rückflußkühler gekocht. Man läßt erkalten, verdünnt die gekochte Masse auf ca. 500 *cm*³, kocht nochmals auf und filtriert heiß durch einen mit Asbest ausgelegten *Gooch*schen Tiegel mit Hilfe der Saugpumpe. Der Rückstand im Tiegel wird mit reichlich heißem Wasser, erwärmtem Alkohol, Alkoholäther und Äther ausgewaschen, bis das Filtrat farblos abläuft. Tritt beim Filtrieren Verstopfung ein, so kann man den Niederschlag im Tiegel mit einem Spatel vorsichtig von der Mitte der Asbestfläche nach den Seiten schieben. Der *Gooch*sche

[1]) *J. König*, Die Zellmembran und ihre Bestandteile in chemischer und physiologischer Hinsicht. Landwirtschaftliche Versuchsstationen. Bd. 65. S. 55—110. 1906.

Tiegel wird dann getrocknet (105°) und gewogen, der Inhalt im Tiegel verascht und der Tiegel mit der Asche gewogen. Die Differenz zwischen beiden Gewichten gibt das Gewicht der aschefreien Rohfaser.

Nochmals sei darauf hingewiesen, daß die *König*sche Rohfaser in ihrer Zusammensetzung mit der durch andere Verfahren gewonnenen Rohfaser keineswegs identisch ist. Sicherlich werden auch durch die Einwirkung von Säuren, Alkalien und Glyzerinschwefelsäure Rohfaserbestandteile in verschiedenstem Umfange gelöst und gehen beim Abheben und Filtrieren verloren. Für die *Weender* Methode hat man darauf aufmerksam gemacht, daß speziell elastisches Gewebe nicht gelöst wird und als Rohfaser mit bestimmt wird, worauf bei der Untersuchung von Fäzes, die von einer reichlich Fleisch enthaltenden Nahrung stammen, zu achten ist.

Zellulose.

Alles, was bezüglich der Ungenauigkeit der Rohfasermethoden gesagt wurde, gilt in gleichem Sinne für die Bestimmung der Zellulose. Zur Reindarstellung und quantitativen Bestimmung der Zellulose sind wir wie bei der Rohfaserbestimmung gezwungen, die Zellulose aus einem Gemisch von Eiweißsubstanzen, Fett, Kohlehydraten, inkrustierenden Substanzen und Hemizellulosen möglichst rein herauszuschälen. Keine der bisherigen Methoden ist so beschaffen, daß es dabei nachweislich ohne Zelluloseverluste abginge. Denn die angewendeten chemischen Mittel wirken bei den verschiedenen Methoden entweder zu schwach, und wir erhalten dann keine Reinzellulose, oder sie wirken zu energisch, und dann gibt es eben Zelluloseverluste. Den richtigen Mittelweg inne zu halten besteht vorläufig noch keine Möglichkeit. Wir wissen nicht, bis zu welchem Grade der Konzentration bei der Untersuchung zellulosehaltigen Materials auf Reinzellulose wir chemische Mittel einwirken lassen dürfen, wenn sie in ihrer lösenden resp. oxydierenden Wirkung eben vor der Zellulose Halt machen sollen. Dazu reichen unsere Kenntnisse von der chemischen Beschaffenheit reiner Zellulose noch nicht aus. Wissen wir doch, daß schon verdünnte Säuren und Alkalien Zellulose lösen können. Es herrschen also auch hier unkontrollierbare Verhältnisse, und deshalb kann an die Zellulosemethoden im allgemeinen nicht der strenge Maßstab bezüglich peinlichster Übereinstimmung der Kontrollanalysen angelegt werden, der bei anderen quantitativen chemischen Methoden selbstverständlich unerläßlich ist. Man muß sich also bei Benutzung jeder Zellulosemethode von vornherein darüber klar sein, daß jede Methode eine anders beschaffene Zellulose liefert. Ferner leiden fast alle Zellulosemethoden an dem Fehler, daß sie viel zu lange Zeit in Anspruch nehmen, was ihrer Verwendung sehr im Wege steht. Die beste Zellulosemethode wird immer die sein, die es ermöglicht, die Bestimmungen in möglichst kurzer Zeit auszuführen und möglichst reine, d. h. von den sonstigen Rohfaserbestandteilen befreite Zellulose zu gewinnen.

Dieser Forderung scheint mir noch am meisten trotz mancher unten zu erwähnender Einwände die von *Simon* und *Lohrisch*[1, 2]) angegebene Methode zur Reindarstellung und quantitativen Bestimmung der Zellulose zu entsprechen. Die Methode knüpft an an eine von *G. Lange* angegebene, immerhin noch sehr umständliche Methode, bei der die Zerstörung der der Zellulose beigemischten Substanzen durch schmelzendes Alkali erfolgt, ohne daß dabei die eigentliche Zellulose zerstört wird. Dieser Vorgang wird auch

---

[1]) *O. Simon* und *H. Lohrisch*, Eine neue Methode der quantitativen Zellulosebestimmung in Nahrungsmitteln und Fäzes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 42. H. 1 u. 2. S. 55—58. 1904.

[2]) *H. Lohrisch*, Über die Bedeutung der Zellulose im Haushalte des Menschen. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 47. H. 2 u. 3. S. 215—219. 1906.

bei der Methode *Simon-Lohrisch* benutzt, die Wirkung des Ätzkalis aber noch durch Zusatz von H_2O_2 unterstützt und schließlich etwaige in Lösung gegangene Zellulose durch Alkohol wieder ausgefällt. Im einzelnen wird wie folgt verfahren: Zirka 3—5 *g* feinst pulverisierte lufttrockene Fäzes werden in ein zirka 500 *cm*³ fassendes Becherglas gebracht und zunächst mit 100—150 *cm*³ heißem Wasser übergossen. Mit dem Glasstabe wird die Substanz in dem Wasser möglichst fein verrührt, so daß von dem Fäzespulver keine gröberen Bröckel mehr sichtbar sind. Zu dieser Aufschwemmung setzt man nun soviel Gramm Ätzkali in Stangen, daß eine 50%ige Lauge entsteht. Es erfolgt beim Schmelzen des Alkalis starke Erhitzung und lebhaftes Aufschäumen, weshalb der Alkalizusatz nur portionsweise erfolgen darf. So wird erreicht, daß das Ätzkali bereits im schmelzenden Zustande bei starker Hitze auf die inkrustierenden Substanzen und sonstigen Fäzesbestandteile einwirken kann. Nachdem sich alles Kali gelöst hat, kocht man eine Stunde im Wasserbade. Nach dieser Zeit ist ein großer Teil der Substanz gelöst. Man läßt die Flüssigkeit ziemlich erkalten und setzt dann 3—5 *cm*³ 30%iges H_2O_2 *(Merck)* zu. Der Zusatz muß vorsichtig tropfenweise, am besten aus einer Meßpipette erfolgen, da die Flüssigkeit stark aufschäumt. Sollte das Aufschäumen so intensiv sein, daß der Inhalt des Becherglases den Rand desselben zu überschreiten droht, so genügt es, aus der Spritzflasche eine kleine Menge 96%igen Alkohols aufzuspritzen, um das Überschäumen zu verhindern. Unter dem H_2O_2-Zusatz tritt eine neuerliche starke Erhitzung ein, bei der noch die letzten Reste organischer Substanzen außer der Zellulose zerstört und zersprengt werden. Gleichzeitig entfärbt sich die Flüssigkeit. Selbst anfangs tiefschwarz aussehende Flüssigkeit erscheint jetzt hellgelb oder hellbraun. Das bietet den Vorteil, das man etwa noch ungelöste Brocken erkennen kann, in welchem Falle man noch ½—¾ Stunde im Wasserbade kocht. Nachdem die helle Flüssigkeit etwas abgekühlt ist, setzt man das halbe Volumen 96%igen Alkohols zu. Oft mischen sich die Flüssigkeiten nicht sofort. Der Alkohol schwimmt oben auf wie Öl auf Wasser. Es genügt dann ein tropfenweiser Zusatz von 6—7 *cm*³ konzentrierter Essigsäure, welche Zellulose nicht angreift, um eine gleichmäßige Mischung zu erzielen. Die etwa gelöst gewesene Zellulose fällt als feiner Niederschlag aus. Die Flüssigkeit ist dabei natürlich noch so stark alkalisch, daß alle Eiweißstoffe in Lösung bleiben. Nun wird möglichst heiß durch ein gehärtetes Filter (*Schleicher* und *Schüll* Nr. 575, 24 *cm* Durchmesser) abfiltriert. Das Filtrieren geht meist so schnell vonstatten, daß man eine Saugpumpe nicht nötig hat. Der Rückstand im Filter ist unlösliche + lösliche Zellulose + Asche. Um aus dem Rückstand schon den größten Teil des Alkalis zu entfernen und sich dadurch das spätere Filtrieren zu erleichtern, ist es zweckmäßig, noch 1—2mal mit heißem Wasser nachzuwaschen, was ebenfalls sehr schnell vor sich geht. Nunmehr wird der Rückstand vom Filter ins Becherglas zurückgespritzt, mit reichlich warmem Wasser aufgenommen, auf einem gewogenen Filter (*Schleicher* und *Schüll* Nr. 589, 12½ *cm* Durchmesser) filtriert und mit

heißem Wasser ausgewaschen, bis das Spülwasser keine alkalische Reaktion mehr gibt. Dieses Filtrieren geht ebenfalls rasch vor sich, zumal wenn man darauf achtet, daß zunächst die im Becherglase überstehende Flüssigkeit getrennt vom Sediment auf das Filter gebracht wird. Dann wird mit verdünnter warmer Essigsäure zur Entfernung der anorganischen Salze gewaschen, die Essigsäure wird mit Wasser ausgewaschen, zuletzt wird mit heißem Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und gewogen. Der Aschegehalt muß von dem Gewicht in Abzug gebracht werden. Ein etwaiger N-Gehalt ist so geringfügig, daß er vernachlässigt werden kann. Vorherige Extraktion sehr fettreicher Fäzes mit Äther ist nicht nötig.

Die Methode ist, wie ich mich durch reichliches und langjähriges Arbeiten damit überzeugt habe, durchaus brauchbar, wenn es sich darum handelt, Ausnutzungsversuche anzustellen, bei denen es auf einen Vergleich zwischen der eingeführten und ausgeschiedenen Zellulose ankommt. Wenn man hierbei im Fütterungsmaterial und im Kot die Zellulose mit der Methode bestimmt und dabei größten Wert darauf legt, daß die Kochzeiten in allen Analysen peinlichst genau eingehalten werden, daß immer die gleichen Mengen Lauge und H_2O_2 bei gleicher Hitze angewendet werden, so erhält man Analysenresultate, die sich sehr wohl verwerten lassen und vor allen Dingen genügen, um die zugeführte mit der ausgeschiedenen Zellulose zu vergleichen. *Scheunert*[1, 2]) fand die Differenzen in den Kontrollanalysen größer als bei anderen Methoden und führt dies zurück vor allem auf die Verwendung des H_2O_2, welches Zellulose, zumal bei Gegenwart von Alkali, in der Tat stärker anzugreifen scheint als andere Chemikalien. Läßt man aber das H_2O_2 weg, so begibt man sich damit des Vorteils, reine Zellulose zu bekommen. Ich würde deshalb lieber eine etwas größere Differenz in den Resultaten der Kontrollanalysen vorziehen, zumal diese Differenzen bei sorgfältigster Herstellung ganz gleichmäßiger Verhältnisse bei Ausführung der Analysen meiner Erfahrung nach nie so groß werden können, um das Resultat erheblich zu trüben. Ich[3]) habe erst in neuerer Zeit gelegentlich eines Hundeversuchs wieder gezeigt, daß sich damit doch recht brauchbare Analysen ausführen lassen. Gelegentlich allerdings trifft man wohl einmal Fälle an, in denen auch in zahlreichen Analysen keine rechte Übereinstimmung zu erzielen ist. Hier spielt offenbar die Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials eine Rolle. In solchen Fällen muß man sich eben mit einem Mittelwerte aus den am meisten übereinstimmenden Analysen zufrieden geben. Führt man aber dabei eine genügend große Anzahl Analysen aus, so ist die Fehlerbreite dann auch keine allzu große. Es sind also die *Scheunert*schen Bedenken nicht unberechtigt. Die Mängel der Methode sind aber in den geschilderten eigenartigen Verhältnissen begründet und werden sich vorläufig noch nicht vermeiden lassen. Die Einwände *Scheunerts* treffen übrigens jede andere Methode ebenso, auch z. B. die weiter unten erwähnte Zellulosemethode von *König*. Auf den Alkoholzusatz legt *Scheunert* keinen Wert. Dies ist für viele Fälle wohl richtig, wenn keine Zellulose in Lösung gegangen ist. Wo aber Zellulose gelöst ist, muß sie durch Alkoholzusatz gefällt werden, sonst würde sie mit dem Filtrate zu Verlust gehen, was die Fehler der Methode noch mehr vergrößern würde. Es ist deshalb, da man nie wissen kann, ob Zellulose in Lösung geht, in jedem Falle angebracht, den Alkoholzusatz zu verwenden.

[1]) *A. Scheunert* und *E. Lötsch*, Vermag der Hund Zellulose oder Rohfaser zu verdauen? Biochem. Zeitschr. Bd. **20**. H. 1 u. 2. S. 10—21. 1909.

[2]) *A. Scheunert* und *E. Lötsch*, Über die quantitative Zellulosebestimmung mit Hilfe der Methoden von „*Lange*“ und „*Simon* und *Lohrisch*“. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **65**. H. 3. S. 219—231. 1910.

[3]) *H. Lohrisch*, Bemerkungen zur Frage der Zelluloseverdauung beim Hunde und über die Methoden der quantitativen Zellulosebestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **69**. H. 2. S. 143—151. 1910.

Scheunert und *Lötsch*[1]) führen unsere Methode in folgender Weise modifiziert und vereinfacht aus:

1—2 *g* fein gemahlene Substanz wird in einem Becherglase mit 100 cm^3 kaltem Wasser verrührt, in welches nach und nach 100 *g* Kalistangen eingetragen werden. Nach Lösung des Kalis wird auf dem siedenden Wasserbade eine Stunde lang erhitzt, dann durch ein gehärtetes *Schleicher-Schüll*-Filter abfiltriert und bis zum ungefärbten Abfließen des Filtrats mit heißem Wasser nachgewaschen. Dann spritzt man den Rückstand vom Filter in das Becherglas zurück, filtriert durch ein gewogenes Filter und wäscht mit heißem Wasser nach bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion des Filtrats. Hierauf wäscht man mit 5%iger heißer Essigsäure dreimal, spült abermals mit heißem Wasser nach bis zum Verschwinden der sauren Reaktion, wäscht mit Alkohol und Äther und trocknet. Der Aschegehalt ist vom Gewichte abzuziehen.

Bei diesem Verfahren wird die Zellulose natürlich nicht so rein erhalten wie bei *Simon-Lohrisch*. Immerhin wird man auch bei gleichmäßiger Anwendung dieses Verfahrens vergleichbare Resultate erzielen können.

Erwähnt sei noch das *König*sche[2]) Verfahren der Zellulosedarstellung, welches ebenfalls, trotz Anwendung von H_2O_2, gute Resultate geben soll, aber sehr umständlich und langwierig ist.

Das Verfahren gestaltet sich zunächst genau so wie das oben angegebene *König*sche Rohfaserverfahren. Es wird mit Glyzerinschwefelsäure gekocht, durch den *Gooch*-Tiegel filtriert und der Rückstand mit warmem Alkohol und Äther gewaschen. Nun wird der Rückstand mit dem Asbest aus dem Tiegel in ein etwa 800 cm^3 fassendes Becherglas gebracht und mit ca. 150 cm^3 chemisch reinem dreigewichtsprozentigen H_2O_2 und 10 cm^3 24%igem Ammoniak versetzt und ca. 12 Stunden stehen gelassen. Dann werden 10 cm^3 30%iges Wasserstoffsuperoxyd zugesetzt, der Zusatz noch einige Male wiederholt und auch noch einige Male 5 cm^3 24%iger Ammoniak zugegeben, bis die Masse weiß geworden ist. Dann erwärmt man 2 Stunden im Wasserbade und filtriert wieder durch Asbest. Der gewaschene Rückstand wird samt dem Asbest mit 75 cm^3 Kupferoxydammoniak erwärmt und dann durch einen *Gooch*-Tiegel filtriert. Das Filtrat wird mit 300 cm^3 80%igem Alkohol versetzt und stark gerührt. Hierdurch scheidet sich die Zellulose in großen Flocken quantitativ wieder aus. Sie wird auf dem Filter gesammelt, gewogen und verascht.

Von größter Wichtigkeit ist es, bei der Ausführung von Ausnutzungsversuchen, bei denen es darauf ankommt, die Menge der eingeführten mit der wieder ausgeschiedenen Zellulose zu vergleichen, darauf zu achten, daß zur Fütterung nicht reine Zellulosepräparate benutzt werden, die mit einer der genannten Zellulosemethoden hergestellt worden sind. *Scheunert*[3]) zeigte näm-

[1]) *A. Scheunert* und *E. Lötsch*, Vermag der Hund Zellulose oder Rohfaser zu verdauen? Biochem. Zeitschr. Bd. **20**. H. 1 u. 2. S. 18—19. 1909.

[2]) *J. König*, Die Zellmembran und ihre Bestandteile in chemischer und physiologischer Hinsicht. Landwirtschaftliche Versuchsstationen. Bd. **65**. S. 55—110. 1906.

[3]) *A. Scheunert* und *E. Lötsch*, l. c. S. 10—21.

lich, daß Zellulose, die mit einer der obigen Methoden dargestellt ist, bei nochmaliger Behandlung mit der gleichen Methode ziemlich beträchtliche Substanzverluste erleidet. Es kann also, wenn eine künstlich dargestellte verfütterte Reinzellulose im Kote nochmals in der gleichen Weise behandelt wird, ein Zelluloseverlust im Kote vorgetäuscht werden, der dann fälschlicherweise als verdaute Zellulose gebucht wird. Als Material für Zellulosefütterungen dürfen danach nur natürliche Pflanzenpräparate (getrocknetes fein gemahlenes Weißkraut[1]) u. a.) benutzt werden, deren Zellulosegehalt durch eine der Methoden bestimmt werden muß. Selbstverständlich muß zur Bestimmung der Zellulose im Fütterungsmaterial und in den Fäzes immer dieselbe Methode angewendet werden.

Nachweis von Umsetzungsprodukten der Kohlehydrate und Zellulose.

Flüchtige Fettsäuren.

Die flüchtigen Fettsäuren (Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure) erhält man durch Destillation. *Hoppe-Seyler*[2]) geht so vor, daß die Fäzes zunächst mit Alkohol extrahiert, filtriert, das Filtrat mit kohlensaurem Natron neutralisiert, zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und destilliert wird.

Nach *Hecht*[3, 4]) ist einfacher folgendes Verfahren: 50 *g* feuchte gewogene Fäzes werden mit 3 *l* Wasser in einen großen Rundkolben gespült und mit 20 *cm*³ konzentrierter Orthophosphorsäurelösung von Syrupskonsistenz versetzt. Nun wird mittelst einer großen Kupferblase eine lebhafte Wasserdampfdestillation vorgenommen und das erste Liter und dann die folgenden 8 Liter gesondert mit $\frac{1}{10}$-Normallauge auf ihren Säuregehalt titriert.

Die überdestillierten flüchtigen Fettsäuren können durch folgende chemischen und mikrochemischen Reaktionen identifiziert werden: Ein Teil des ersten abdestillierten Liters wird mit Natronlauge fast neutralisiert und schwachsauer eingedampft. Nachdem die Flüssigkeit auf kaum 1 *cm*³ eingeengt ist, wird kalt filtriert und das Filtrat mit Zeritnitrat versetzt. Ein Tropfen davon auf den Objektträger gebracht, läßt besonders nach leichtem Anwärmen charakteristische radialfaserige Aggregate mit negativem *Brewster*schen Polarisationskreuz erkennen, wodurch Ameisensäure nachgewiesen wird. Ameisensäure gibt ferner mit neutralem Eisenchlorid bei neutraler Reaktion eine Dunkelrotfärbung der Lösung und beim Kochen einen gelben Niederschlag.

Das übrige Destillat wird mit Kalkmilch abgestumpft und gleichfalls schwachsauer eingedampft. Die konzentrierte Lösung der Kalksalze

[1]) *H. Lohrisch*, Bemerkungen zur Frage der Zelluloseverdauung beim Hunde und über die Methoden der quantitativen Zellulosebestimmung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 69. H. 2. S. 144. 1910.

[2]) Zit. nach *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 111—112. Berlin und Wien 1910.

[3]) *Ad. Hecht*, l. c. S. 112—113.

[4]) *Ad. Hecht*, Das Verhalten der Fettsäurebildung im Darminhalt des Säuglings. Münchener med. Wochenschr. 1910. Nr. 2. S. 63—67.

wird wieder kalt filtriert und daraufhin werden folgende Proben angestellt:

Ein Tropfen wird mit etwas Uranylnitrat, Natriumformiat und Ameisensäure versetzt. Es scheiden sich besonders nach leichtem Erwärmen und raschem Abkühlen schöne nicht polarisierende Tetraeder und Oktaeder von Uranylazetat aus, was für Essigsäure beweisend ist. Essigsäure gibt mit neutralem Eisenchlorid dieselbe Reaktion wie Ameisensäure. Beim Erwärmen mit einem Gemisch gleicher Volumina konzentrierter H_2SO_4 und Alkohol tritt der charakteristische Essigsäureäthylestergeruch auf.

Eine andere Probe wird mit Baryumazetat versetzt. Es erscheinen Pseudooktaeder, die im polarisierten Licht als doppeltbrechend und Durchwachsungszwillinge erkannt werden. Hierdurch wird die Propionsäure erkannt.

Der Rest der Kalksalzlösung wird mit Kupfernitrat versetzt, worauf die Kupfersalze der Propionsäure, der Buttersäure und der Valeriansäure in meist sehr charakteristischen Formen (besonders die Valeriansäurekristalle) auskristallisieren. Die Buttersäurekristalle sind an der charakteristischen Schwalbenschwanzzwillingsform zu erkennen.

Milchsäure.

Der nach der Entfernung der flüchtigen Fettsäuren zurückbleibende Destillationsrückstand kann nach *Strasburger*[1]) in folgender Weise zur quantitativen Bestimmung von Milchsäure verwendet werden: Der Destillationsrückstand wird mit Wasser verdünnt, mit Baryt ausgefällt, filtriert und nachgewaschen. Das Filtrat wird durch CO_2 von überschüssigem Baryt befreit, bei mäßiger Temperatur (nicht über 70° C) eingeengt und dreimal mit der 10fachen Menge Alcohol absol. ausgezogen. Nach Verdunsten des Alkohols versetzt man den Rückstand mit der gleichen Menge Phosphorsäure und schüttelt mit der 10fachen Menge Äther ca. fünfmal aus. Da etwas Phosphorsäure mitgerissen resp. gelöst wird, so sucht man durch Dekantieren sowie Verdunsten des Äthers und nochmaliges Lösen in diesem die Phosphorsäure zu entfernen. Nunmehr wird der Äther vertrieben, der Rückstand = Milchsäure in Wasser gelöst und die Menge durch Titration bestimmt.

Der qualitative Nachweis der Milchsäure in dem zur Ausschüttelung benutzten Äther geschieht so, daß man im Reagenzglase zu 5 cm^3 des Äthers 2 Tropfen einer 10%igen Eisenchloridlösung zusetzt, worauf die bekannte gelbgrüne bis intensiv grüne Färbung des Äthers durch Bildung von milchsaurem Eisen eintritt. Statt der Eisenchloridlösung kann auch das *Uffelmann*sche Reagens (3 Tropfen Eisenchloridlösung: 30 cm^3 1%iger Karbolsäurelösung) genommen werden. Die amethystblaue Farbe des Reagens wird durch Milchsäure in Zeisiggelb oder Gelbgrün verwandelt.

[1]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Auflage. S. 202. Berlin 1905.

Nachweis von Gallenbestandteilen.

Gallensäuren.

Die Gallensäuren (Glykochol- und Taurocholsäure) erscheinen unverändert nur unter pathologischen Verhältnissen (starke Durchfälle, mangelhafte Reduktionsprozesse) in den menschlichen Fäzes wieder. Unter normalen Umständen wird der größere Teil der Säuren im unteren Dickdarm resorbiert, der kleinere Teil im Dickdarm unter dem Einflusse der Fäulnis gespalten in Glykochol, Taurin und Cholalsäure. Es ist also, um Gallensäure nachzuweisen, unter normalen Verhältnissen insbesondere auf Cholalsäure zu fahnden.

Um die Cholalsäure rein darzustellen, ist es nötig, sie zu isolieren durch Extraktion der Fäzes mit Alkohol und Entfernung der Fettkörper aus dem alkoholischen Extrakte durch Fällung mit Barytlösung. *Hoppe-Seyler*[1]) verfährt in folgender Weise: Man extrahiert die Fäzes mit Alkohol, filtriert, dampft unter Zusatz von etwas Essigsäure auf dem Wasserbade zum Syrup ein und zieht den Rückstand mit kaltem Wasser aus. Das Ungelöste wird mit Barytwasser übergossen und nach Zufügen von etwas Wasser erwärmt. Man leitet jetzt Kohlensäure bis zur neutralen Reaktion ein, erhitzt zum Sieden, filtriert heiß, erschöpft den Rückstand durch Auskochen mit heißem Wasser und dampft die vereinigten heiß filtrierten Auszüge auf ein kleines Volumen ein. Nach dem Erkalten wird etwas Äther und dann Salzsäure zugefügt, gut umgerührt und eine Zeitlang stehen gelassen, wobei der Äther verdunsten kann. Man filtriert die ausgeschiedene Cholalsäure ab, wäscht mit Wasser, löst in Alkohol, dampft die alkoholische, nötigenfalls mit Tierkohle entfärbte Lösung auf ein kleines Volumen ein und läßt zur Kristallisation stehen. Die ausgeschiedenen Kristalle werden mit Hilfe der *Pettenkofer*schen Reaktion auf Cholalsäure geprüft.

*Pettenkofer*sche Probe. Fügt man zu einer etwas Cholalsäure enthaltenden wässerigen Flüssigkeit im Reagenzglas etwas Rohrzucker und dann allmählich tropfenweise unter Umschütteln konzentrierte H_2SO_4, indem man durch Erwärmen oder Abkühlen in kaltem Wasser die Temperatur auf etwa 70° erhält, so tritt, wenn die zunächst gefällte Cholalsäure durch den weiteren Zusatz der Schwefelsäure wieder gelöst ist und noch weitere Schwefelsäure zugesetzt wird, eine zuerst kirschrote, dann prachtvoll purpurrote Färbung der Flüssigkeit ein, die sich im Verlaufe von 8 Tagen unter allmählichem Dunklerwerden in eine blaurote Farbe umwandelt. Diese Reaktion beruht auf der Einwirkung des Furfurols, welches aus dem Zucker durch Schwefelsäure gebildet wird. Die purpurrote Lösung zeigt, hierzu am besten mit Alkohol verdünnt, einen Absorptionsstreifen rechts von *D*, einen zweiten bei *E*. Anwesenheit von Eiweißstoffen, viel Farbstoffen oder oxydierenden Substanzen kann die Reaktion beeinträchtigen.

Der Nachweis der gepaarten Gallensäuren und der Cholalsäure geschieht nach *Hoppe-Seyler* folgendermaßen: Man extrahiert die Fäzes mit Alkohol, filtriert, entfernt den größten Teil des Alkohols durch

[1]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 218. Berlin 1905.

Eindampfen, macht mit Salzsäure sauer, dann mit Barytwasser stark alkalisch, leitet CO_2 ein, erhitzt zum Kochen, filtriert heiß und kocht den Rückstand noch mehrmals mit Wasser aus. Die vereinigten Filtrate werden auf ein kleines Volumen eingedampft. Beim Erkalten scheidet sich cholalsaurer Baryt ab, während glykocholsaurer und taurocholsaurer Baryt in Lösung bleiben. Der cholalsaure Baryt wird durch Behandeln mit Salzsäure, wie oben angegeben, in Cholalsäure überführt. Zur weiteren Trennung der Glykocholsäure von der Taurocholsäure dient das verschiedene Verhalten dieser Säuren gegen Bleizuckerlösung. Glykocholsäure und Cholalsäure werden durch Bleizucker gefällt, während dabei nur sehr geringe Mengen Taurocholsäure mitgerissen werden, wenn die Flüssigkeit nicht stark alkalisch ist. Nach der Ausfällung dieser Säuren kann die Taurocholsäure durch Bleiessig und etwas Ammoniak gefällt werden. Über die verschiedenen Methoden zur Identifizierung der Säuren außer der *Pettenkofer*schen Reaktion vgl. *Hoppe-Seyler.*[1])

Die Cholalsäure geht auch in das Ätherextrakt der Fäzes mit über. Wenn man den vom Cholestearin befreiten getrockneten Rückstand des Gesamtätherextraktes (vgl. S. 368) mit Barytwasser unter Erwärmen schüttelt, so kommt es zur Bildung von Barytseifen und cholalsaurem Baryt. Die Seife wird abfiltriert und mit heißem Wasser gewaschen. Der cholalsaure Baryt geht ins Waschwasser über und kann wie oben weiter verarbeitet werden.

Nach *Ury*[2]) werden die gepaarten Gallensäuren und die Cholalsäure in folgender Weise nachgewiesen: Man extrahiert die Fäzes mit Alkohol, filtriert, engt auf ein geringes Flüssigkeitsquantum ein, säuert mit HCl an, macht mit Barytwasser stark alkalisch, leitet CO_2 ein und erhitzt zum Kochen. Es wird heiß filtriert und der Rückstand mehrere Male mit Wasser ausgekocht. Hierauf werden die Filtrate vereinigt, eingedampft und der Rückstand, um etwa gepaart anwesende Gallensäuren zu verseifen, mit 25 cm^3 33%iger Natronlauge 3 Stunden gekocht, indem das Wasser immer wieder durch heißes ersetzt wird. Dann säuert man mit Schwefelsäure an, schüttelt mit Äther aus und löst den Ätherrückstand in wenig verdünnter Natronlauge und prüft auf Cholalsäure mittelst der *Pettenkofer*schen Probe. Die Rotfärbung allein genügt nicht; man gießt daher die Lösung in Eisessig und sieht nun, ob die Flüssigkeit rot gefärbt ist und das charakteristische Spektrum zeigt.

Gallenfarbstoffe.

Die Farbstoffe der Galle, die in den Darm ergossen wird, werden zum größeren Teil im Urin und in den Fäzes ausgeschieden. Der Hauptanteil der ausgeschiedenen Gallenfarbstoffe kommt auf die Fäzes. Der normale Fäzesfarbstoff ist Hydrobili-

[1]) *F. Hoppe-Seyler* und *H. Thierfelder*, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. VII. Aufl. Berlin 1903.

[2]) Zitiert nach *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes S. 165. Berlin und Wien 1910.

rubin, entstanden durch Reduktion des Bilirubins, die im Blinddarm und oberen Teile des Dickdarms stattfindet.

Früher nahm man an, daß das Hydrobilirubin der Fäzes und das Urobilin des Harns identisch seien. Jetzt wissen wir, daß das nicht der Fall ist, denn Hydrobilirubin enthält nach *Maly* 9·45% N, das Urobilin nach *Garrod* und *Hopkins* 4·11% N. Neuerdings hat *Fromholdt*[1]) noch ein hydrobilirubinartiges Pigment dargestellt mit 5·93% N. Nach *Fromholdt* ist es nicht unwahrscheinlich, daß die Zahl dieser Körper sich noch vermehren läßt, und er hält es deshalb für richtiger, von einer Hydrobilirubingruppe zu sprechen, in die die genannten Pigmente und eventuell auch noch andere hineingehören, die in ihren spektralen Eigenschaften gleich, in ihrem N-Gehalte aber verschieden sind.

Hydrobilirubin.

Qualitativer Nachweis. Die einfachste Methode ist die Sublimatprobe von *Ad. Schmidt.*[2]) Diese wird so ausgeführt, daß man von den möglichst frischen Fäzes ein etwa hasel- bis walnußgroßes Stück im Mörser mit einer nicht zu kleinen Menge konzentrierter wässeriger Sublimatlösung (Sublimat 25·0, Na Cl 2·5, Aqua dest. 500·0) fein verreibt und das Gemisch in einem zugedeckten Petrischälchen bis 24 Stunden stehen läßt. Es färben sich dann sehr schnell alle hydrobilirubinhaltigen Teilchen intensiv ziegelrot infolge von Bildung des leuchtend roten, gelb fluoreszierenden Quecksilberchlorid-Hydrobilirubins, so daß die ganze Stuhlmenge diese Farbe annimmt. Am schönsten kommt die Farbe an ganz frischen Fäzes heraus. Kot, der längere Zeit gestanden hat, gibt rotbraune bis schmutzigbraune Farbe.

Eine weitere qualitative Probe besteht im Nachweis der Fluoreszenz des Hydrobilirubins:

10 cm^3 wässerigen geklärten (Kieselguhr) Fäzesextraktes werden mit 10 cm^3 alkoholischer Zinkazetatlösung (10%ige Zinkazetatlösung in absolutem Alkohol) im Reagenzglas vermischt und umgeschwenkt. Ein etwa entstehender Niederschlag wird abfiltriert. Im Filtrat Fluoreszenz.

Oder[3]): Eine kleine Menge Kot wird im Reagenzglas mit saurem Alkohol übergossen und eine Zeitlang stehen gelassen. Wenn Gelb- oder Braunfärbung des Alkohols aufgetreten ist, wird derselbe abgegossen und mit ein paar Tropfen Ammoniak und Chlorzinklösung versetzt. Oder man versetzt ein mit ammoniakhaltigem Wasser hergestelltes und filtriertes Fäzesextrakt mit Chlorzink. Es entsteht ein dunkelroter Niederschlag, welcher auf ein Filter gebracht und mit ammoniakhaltigem Alkohol ausgezogen wird. Es tritt dann sehr schön die Fluoreszenz auf, ferner kann man das Hydrobilirubin in dieser Lösung an seinem charakteristischen Spektrum erkennen: das alkalische Hydrobilirubin hat zwischen *b* und *F*, näher an *b* gelegen, einen Absorptionsstreifen; beim Ansäuern der Lösung rückt der Streifen nach *F* zu.

---

[1]) *G. Fromholdt*, Beiträge zur Urobilinfrage. Zeitschr. f. exp. Path. u. Therapie 7. Bd. H. 3. S. 717. 1910.

[2]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 220—221. Berlin 1905.

[3]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, l. c. S. 221.

Leukohydrobilirubin wird in dem sauren alkoholischen Extrakt bei Zusatz von Chlorzink und Ammoniak oder auch durch 1—2 Tropfen Jodtinktur sehr leicht in Hydrobilirubin umgewandelt.

Oder[1]): 3—4 *g* Stuhl werden mit 30 *cm*³ Amylalkohol verrieben und im Filtrat das charakteristische Spektrum das Hydrobilirubins aufgesucht.

Zu diesen Proben können auch getrocknete Fäzes verwendet werden.

Die bekannten tonfarbigen Fettstühle kommen beim Menschen im allgemeinen dann zur Beobachtung, wenn der Gallezufluß zum Darm abgeschnitten ist. Hier ist der Mangel an Hydrobilirubin mittelst der Sublimatprobe ohne weiteres zu erkennen. Es gibt in seltenen Fällen aber auch acholische Stühle bei erhaltenem Gallezufluß in den Darm, bei denen die weiße Farbe lediglich durch den Fettgehalt bedingt ist. Solche Stühle werden, wenn man sie mit Äther entfettet, wieder braun; ferner klärt die Sublimatprobe auf. Weiter können diese acholischen Stühle aber auch dadurch bedingt sein, daß das Bilirubin durch eine zu weit gehende Reduktion zu Leukohydrobilirubin umgewandelt worden ist. In diesem Falle wird der Stuhl, wenn man ihn an der Luft stehen läßt, an der Oberfläche durch Oxydation wieder braun. Die Sublimatprobe gibt mit Leukohydrobilirubin ebenfalls schöne Rotfärbung.

Quantitativer Nachweis. Die Methoden zum quantitativen Nachweis des Hydrobilirubins sind schwierig auszuführen und sind nicht als ganz exakt zu bezeichnen, da das Hydrobilirubin ein leicht veränderlicher Körper ist. Sie liefern, wie schon oben *(Fromholdt)* erwähnt, nicht immer gleichmäßig zusammengesetzte Pigmente (N), während die optischen Eigenschaften der Pigmente übereinstimmen. Es ist deshalb eigentlich nötig, in den dargestellten Pigmenten immer den N-Gehalt zu bestimmen. Alle Methoden stützen sich auf die von *Friedrich Müller* ursprünglich angegebene Methode zur Darstellung des Urobilins aus dem Harn. Das Verfahren von *Müller*[2]) wird in folgender Weise ausgeführt, wobei einige kleine Modifikationen von *Tsuchiya-Brugsch*[3]) berücksichtigt sind:

Eine gewogene Menge des frischen oder trockenen pulverisierten Kotes wird mit Wasser verdünnt und mit heißer Barytmischung (1 Vol. gesättigte Chlorbaryumlösung + 2 Vol. gesättigte Barythydratlösung) verrieben, aufgekocht, filtriert und der Filterrückstand noch mehrmals mit heißer Barytmischung und Wasser gewaschen, wodurch das Hydrobilirubin dem Niederschlag bis auf einen kleinen Rest entzogen wird. Dann wird im Filtrat das überschüssige Baryt durch konzentrierte Natriumsulfatlösung entfernt, mit Schwefelsäure nahezu neutralisiert, filtriert und das Filtrat mit feingepulvertem Ammoniumsulfat (etwa $^1/_3$—$^1/_2$ Vol. der Lösung) ver-

---

[1]) Zitiert nach *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 160. Berlin und Wien 1910.

[2]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Aufl. S. 222—223. Berlin 1905.

[3]) *J. Tsuchiya* (mitgeteilt von *Th. Brugsch*), Beiträge zur Frage der Urobilinausscheidung. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. Bd. 7. H. 1. S. 352—362. 1910.

setzt und unter häufigem Umrühren und Schütteln 24 Stunden stehen gelassen. Enthält die Lösung dann bei der spektroskopischen Untersuchung noch Hydrobilirubin, so wird das Aussalzen mit Ammoniumsulfat wiederholt. Andernfalls wird filtriert. Durch Schwenken des Gefäßes mit dem rückständigen Salze läßt sich an der Wand haftender Farbstoff leicht ablösen. Dann spült man Salz und Gefäß mit dem Filtrat auch auf das Filter aus und wäscht das Filter zuletzt mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Wenn das Filter mit dem Niederschlage oberflächlich lufttrocken geworden ist, wird es in einem Kolben mit aufgesetztem Kühlrohr nach Zusatz von verdünnter Schwefelsäure mit einer Mischung von 1 Teil Äther und 2 Teilen Alkohol in der Wärme ausgezogen. Das Hydrobilirubin löst sich in dem schwefelsauren Ätheralkohol. Ein dreimaliges Extrahieren ist gewöhnlich genügend. Die Lösung wird nun klar abfiltriert und der Rückstand wiederholt mit schwefelsäurehaltigem Alkohol ausgewaschen. Wenn die ätherisch-alkoholische Lösung stark verdünnt ist, so wird sie auf dem heißen Wasserbade mittelst des Luftgebläses eingeengt, um ihr eine gewisse Konzentration zu geben. Das Volumen der Lösung wird dann genau gemessen und auf seinen Farbstoffgehalt untersucht.

Tsuchiya-Brugsch empfehlen zur quantitativen Bestimmung des Hydrobilirubins in der Lösung als exakteste Methode die spektrophotometrische Bestimmung mit dem *König-Martens*schen Spektralphotometer. Eine genaue Beschreibung dieser Methodik siehe bei *Tsuchiya-Brugsch.*[1])

Es kann auch gewichtsanalytisch bestimmt werden so, daß man in der Farbstofflösung Chloroform auflöst und die Mischung in einem Scheidetrichter mit etwa dem doppelten Volumen Wasser schüttelt. Das Chloroform nimmt den Farbstoff auf, setzt sich nach einiger Zeit ab und kann abgelassen werden. Nach dem Verdunsten desselben bleibt der Farbstoff zurück, welcher getrocknet und gewogen wird.

Will man aus der ätherisch-alkoholischen Lösung das Hydrobilirubin in wässeriger Lösung haben, so führt man nach *Tsuchiya-Brugsch*[2]) das Hydrobilirubin wie vorstehend in Chloroform über, läßt das Chloroform aus dem Scheidetrichter ab und wäscht es in dem doppelten Volumen Wasser. Dem Chloroform läßt sich das Urobilin durch langsames Schütteln mit schwach Ammoniak enthaltendem Wasser entziehen, wobei zu beobachten ist, daß bei Gegenwart von viel Ammoniak leicht eine sich nur sehr langsam in ihre Bestandteile scheidende Emulsion entsteht.

Fromholdt[3]) macht darauf aufmerksam, daß bei der Hydrobilirubindarstellung möglichste Schonung des leicht veränderlichen Farbstoffes ge-

---

[1]) *J. Tsuchiya* (mitgeteilt von *Th. Brugsch*), Beiträge zur Frage der Urobilinausscheidung. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. Bd. 7. H. 1. S. 353—357. 1910.

[2]) *J. Tsuchiya* (mitgeteilt von *Th. Brugsch*), l. c. S. 359.

[3]) *G. Fromholdt*, Beiträge zur Urobilinfrage. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. Bd. 7, H. 3. S. 716—717. 1910.

boten erscheint, weshalb besonders starkes Erwärmen vermieden werden soll. Nach seinen Angaben, die für das Urobilin des Urins gemacht sind, würde man für die Fäzes so vorzugehen haben, daß man eine bestimmte Menge Fäzes mit salzsaurem Wasser fein verreibt und extrahiert und das Extrahieren so lange fortsetzt, bis man sicher ist, daß alles Hydrobilirubin aus den Fäzes entfernt ist. Das klar filtrierte Fäzesextrakt, welches eventuell eingeengt wird, wird dann zum Aussalzen des Hydrobilirubins mit Ammoniumsulfat versetzt. Hierauf Filtrieren. Lösen des Niederschlags mit möglichst wenig Natronlauge in Wasser. Filtrieren. Behandeln des Filtrats mit der obigen Barytmischung, solange noch ein Niederschlag entsteht. Filtrieren. Befreiung des Filtrats vom überschüssigen Baryt mit Natriumphosphat und etwas Natriumsulfat. Filtrieren (Abnutschen). Ansäuern des Filtrats mit Salzsäure und Aussalzen mit Ammoniumsulfat. Filtrieren. Trocknen des abfiltrierten Niederschlags im Vakuum über Kalziumchlorid. Extraktion des trockenen Niederschlages mit Chloroformalkohol (30 : 1). Filtrieren. Fällen des Hydrobilirubins aus dem im Vakuum eingeengten Extrakt mit Petroläther.

v. Moraczewski [1]) verfährt zum quantitativen Hydrobilirubinnachweis einfacher so, daß er einen sauren alkoholischen Fäzesauszug im Spektrophotometer untersucht. Die Absorptionsstreifen für saures Hydrobilirubin sind so charakteristisch, und es braucht der alkoholische Auszug eine so große Verdünnung, daß dabei die anderen Kotfarbstoffe nicht in Frage kommen.

Außer dem schon erwähnten Apparat von *König-Martens* können benutzt werden die Spektrophotometer von *Vierordt*, *Hüfner* oder *Glan.* [2])

Bilirubin.

Qualitativer Nachweis: Hierzu wird die *Ad. Schmidt*sche [3]) Sublimatprobe benutzt, die in derselben Weise wie oben angestellt wird. Dabei färben sich alle bilirubinhaltigen Teilchen durch Oxydation des Bilirubins zu Biliverdin grün. Die Probe kann also gelegentlich Hydrobilirubin und Bilirubin gleichzeitig anzeigen. Auch kann darin der Nachweis kleinster bilirubinhaltiger Teile mikroskopisch geführt werden.

Die *Gmelin*sche Probe: Zusatz von salpetrige Säure enthaltender Salpetersäure zu den Fäzes bewirkt schnellen Farbenumschlag der goldgelben Bilirubinfarbe in Grün, Blau, Violett, Rot und Gelb. Die Probe wird am besten so ausgeführt, daß man auf die in einer flachen Glasschale befindliche Salpetersäure kleine Tropfen der mit Wasser fein verriebenen Fäzes fallen läßt. Sie gelingt nur bei reichlichem Bilirubingehalt.

[1]) *W. v. Moraczewski*, Über den Mangel von Relation zwischen Harnindikan und Kotindol. Arch. f. Verdauungskrankh. Bd. 14. S. 378. 1908.

[2]) *Neubauer-Huppert*, Analyse des Harns. 11. Aufl. S. 48—64. Wiesbaden 1910.

[3]) *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustand. 2. Aufl. S. 220—221. Berlin 1905.

Empfindlicher ist die Probe von *Nakayama*.[1]) Hierzu wird benötigt eine 10%ige $BaCl_2$-Lösung und eine Mischung von 99 Teilen 95%igem Alkohol und 1 Teil rauchender Salzsäure, in der auf 1 *l* 4 *g* Eisenchlorid aufgelöst sind. Man mischt nun eine Stuhlaufschwemmung, der man nötigenfalls eine Spur Na_2SO_4 zusetzt, mit der Chlorbaryumlösung zu gleichen Teilen, zentrifugiert und gießt die über dem Barytniederschlag stehende Flüssigkeit ab. Der Niederschlag wird sodann mit 2 *cm*³ des an zweiter Stelle genannten Reagens übergossen und zum Sieden erhitzt. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit färbt sich bei Anwesenheit von Bilirubin grün oder blaugrün.

Quantitativer Nachweis.[2]) Die frischen Fäzes werden mit der *Fr. Müller*schen Barytmischung verrieben, filtriert, der Rückstand mit wenig Essigsäure angesäuert und mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus der Chloroformlösung wird das essigsaure Salz durch Schütteln mit mehreren Portionen Wasser entfernt; dann wird die Chloroformlösung durch Zusatz von Alkohol filtrierbar gemacht und aus dem Filtrate der Alkohol durch erneutes Schütteln mit Wasser wieder entfernt. Die im Scheidetrichter abgeschiedene Chloroformlösung, die den Farbstoff enthält, wird verdunstet, der Rückstand getrocknet und gewogen.

Der Nachweis von Blut in den Fäzes.

Blut, welches aus dem Magen oder aus den oberen Darmabschnitten stammt, wird als Hämatin ausgeschieden. Hierauf beruht der chemische Nachweis des Blutes. Der Nachweis des Hämatins kann nach verschiedenen Methoden erfolgen:

Teichmannsche Häminprobe: Ein kleines auf Blut verdächtiges Kotpartikelchen wird mit nicht zu wenig Eisessig auf dem vorher erwärmten Objektträger verrieben und nach Zusatz einer Spur Kochsalz oder auch eines Tropfens gewöhnlichen Wassers langsam über einer kleinen Flamme erwärmt. Der Eisessig soll dabei nicht ins Sieden kommen und muß, wenn er sehr schnell verdunstet, eventuell noch einmal ersetzt werden. Nach dem Eintrocknen und Abkühlen wird ein Tropfen Wasser oder Glyzerin zugesetzt, das Deckglas aufgelegt und das Präparat im Mikroskop auf die Anwesenheit von braunen, in rhombischen Prismen auftretenden Häminkristallen untersucht. Die Kristalle sind unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, Essigsäure und kalter Salpetersäure, löslich in kochender Salpetersäure, in konzentrierter Schwefelsäure, verdünnter Kalilauge und Ammoniak.

Exakter sind die folgenden Proben:

Weber-van Deensche Probe: 5—10 *g* der gut mit dem Holzspatel durchrührten Fäzes werden in einer Reibeschale mit Wasser, dem ⅓ Vol.

[1]) Zitiert nach *Ad. Hecht*, Die Fäzes des Säuglings und des Kindes. S. 161. Berlin und Wien 1910.

[2]) Zitiert nach *Ad. Schmidt* und *J. Strasburger*, Die Fäzes des Menschen im normalen und krankhaften Zustande. 2. Auflage. S. 223. Berlin 1905.

Eisessig zugesetzt ist, bis zur flüssigen Konsistenz verrieben. Hiervon nimmt man eine größere Portion in ein weites Reagenzglas und schwenkt vorsichtig (nicht zu stark, um Emulsionsbildung zu vermeiden) mit Äther um. Dann läßt man den Äther absetzen und klären. Falls dies sehr langsam geschieht, setzt man einige Tropfen Alkohol zu.

Man kann nun entweder nach *Weber* in dem bei Anwesenheit von Hämatin bräunlich gefärbten Äther das Spektrum des sauren Hämatins nachweisen. Dieses zeigt einen intensiven schmalen Streifen in Rot zwischen *C* und *D* und, gegen diesen an Stärke bedeutend zurücktretend, drei weitere Streifen in Gelb, auf der Grenze zwischen Gelb und Grün und auf der Grenze zwischen Grün und Blau; der letztere ist meist nur schwer erkennbar.

Oder man verfährt nach *van Deen*: Dem abgehobenen Äther setzt man 10 Tropfen frisch bereiteter Guajaktinktur und 20—30 Tropfen altes ozonisiertes Terpentinöl zu. Bei Anwesenheit von Hämatin färbt sich der Äther blau.

In neuerer Zeit ersetzt man die Guajaktinktur durch einige Körnchen pulverisierten Guajakharzes und das Terpentinöl durch 20—30 Tropfen *Merck*sches Perhydrol. Man kann die Guajaktinktur auch durch frisch bereitete Aloinlösung (0·3 Aloin. pulv. auf 10·0 70%igen Alkohol) ersetzen.

Einigermaßen fetthaltige Stühle werden vorher am besten mit Äther entfettet.

Die Benzidinprobe.

Eine noch feinere Methode ist die von *Schlesinger* und *Holst*[1]) angegebene, bei der Benzidin verwendet wird. Die Benzidinreaktion übertrifft nach *Walther*[2]) die mittelst Guajaktinktur und Aloin angestellten Blutproben an Schärfe ganz wesentlich, so daß beim negativen Ausfall der Benzidinreaktion das Vorhandensein von Blut mit der größten Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Der positive Ausfall der Benzidinreaktion ist nur unter gewissen Vorsichtsmaßregeln zu verwerten. *Walther* stellte fest, daß noch Verdünnungen von frischem Blut im Verhältnis 1 : 250000 bei Anwendung der Benzidinraktion deutliche Grünfärbung hervorrufen. Es werden schon minimale Mengen von Fleisch oder sonstigem mit der Nahrung eingeführten Blut damit nachgewiesen. Deshalb ist, wenn man auf okkulte, aus den Verdauungsorganen selbst stammende Blutungen fahndet, streng darauf zu halten, daß der Kot von einer absolut fleisch- und blutfreien Kost stammt (was übrigens auch für die oben genannten Proben gilt).

Ferner kann auch bei völliger Abwesenheit von Blut durch oxydierende Fermente tierischer oder pflanzlicher Herkunft, wie sie häufig im Stuhle vorkommen, ein positiver Ausfall der Benzidinreaktion hervorgerufen werden, was *Schlesinger* und *Holst* dadurch zu verhindern suchen, daß sie sehr kleine Mengen Fäzes benutzen und die Fermente vor Anstellung der Probe durch Kochen zerstören. Erst unter diesen Vorsichtsmaßregeln gestattet der positive Ausfall der Benzidinreaktion, auf die Anwesenheit von Blut, das dem Magen oder Darm entstammt, zu schließen.

Ausführung: Man stellt sich zunächst eine annähernd konzentrierte Lösung von Benzidin (*Merck*) in Eisessig dadurch her, daß man eine

[1]) *E. Schlesinger* und *F. Holst*, Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von Minimalblutungen in den Fäzes nebst einer neuen Modifikation der Benzidinprobe. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 36. S. 1444—1447. 1906.

[2]) *E. Walther*, Über die Verwendung des Benzidins für den Blutnachweis, im besonderen über seine Anwendungsweise in der gerichtsärztlichen Praxis. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 7. S. 309. 1910.

Messerspitze Benzidin in einem sauberen Reagenzgläschen mit etwas Eisessig (etwa 2 *cm*³, wenn mehrere Proben auszuführen sind, entsprechend mehr) übergießt, einige Male umschüttelt und dann beiseite stellt. Das Benzidin löst sich leicht. Um eine konzentrierte Lösung zu erhalten, tut man jedoch gut, während der weiteren Handhabungen diese Benzidineisessiglösung noch einmal durchzuschütteln.

Eine kleine etwa erbsengroße Menge der zu untersuchenden Fäzes wird mit einem Glasstabe in ein sauberes, etwa zu ein Fünftel mit Wasser gefülltes Reagenzglas gebracht und durch rührende Bewegungen mit dem Glasstabe in dem Wasser aufgeschwemmt.

Dann wird das Gläschen durch einen Wattepfropfen verschlossen und die Aufschwemmung über der Flamme einmal zum Aufkochen gebracht, was beim ruhigen Hineinhalten in die Flamme in wenigen Minuten geschieht.

Jetzt gießt man in ein reines Reagenzgläschen etwa 10—12 Tropfen der konzentrierten Eisessigbenzidinlösung und fügt etwa $2^1/_2$—3 *cm*³ 3%iges Wasserstoffsuperoxyd hinzu. Damit ist das Reagens fertig, dessen Inhalt, wenn er seine Farbe unverändert behält, zugleich eine Kontrolle der Reagentien und des Reagenzglases ist.

Hierzu fügt man 1—3 Tropfen der gekochten Fäzeslösung durch einfaches Ausgießen aus dem geneigten Reagenzgläschen nach vorherigem leichten Durchschütteln.

Bei Anwesenheit von Blut färbt sich die durch die wenigen Tropfen der dünnen Fäzeslösung nur in geringem Grade getrübte hellgelb-bräunliche Lösung schön grün, blaugrün oder blau. Je stärker der Blutgehalt ist, desto mehr herrscht das Blau vor.

Folgende Modifikation der Probe von *Schlesinger* und *Holst* schlägt *Messerschmidt*[1]) vor und bezweckt damit die Zerstörung etwa anwesender reduzierender Stoffe und Fermente durch Verreiben des Extraktes mit Essigsäure und Neutralisation alkalischer Fäzes.

Eine Messerspitze Benzidin wird in 2 *cm*³ Eisessig gelöst. Diese Mischung muß jedesmal frisch gemacht werden, da sie nicht lange haltbar ist. In 2 *cm*³ Wasser, dem man einige Tropfen Eisessig zugesetzt hat, verreibt man mittelst Glasstabes in einem Reagenzglas ein erbsengroßes Stück Kot (von flüssigen Fäzes $^1/_2$ *cm*³). Zu 3 Tropfen dieser Fäzeslösung werden 1—$1^1/_2$ *cm*³ (nicht mehr!) 3%iges H_2O_2 zugefügt. Hierzu setzt man 1—2 *cm*³ der Benzidineisessiglösung.

Es empfiehlt sich nicht, zur Anstellung der Probe Fließpapiere, die mit den Reagentien getränkt sind, zu verwenden, z. B. Benzidinpapier, da dabei leicht Täuschungen unterlaufen (*Walther*[2]).

[1]) *Th. Messerschmidt*, Zum klinischen Nachweis von Blut in den Fäzes. Münchener med. Wochenschr. Nr. 8. S. 389. 1909.

[2]) *E. Walther*, Über die Verwendung des Benzidins für den Blutnachweis, im besonderen über seine Anwendungsweise in der gerichtsärztlichen Praxis. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 7. S. 310. 1910.

Die Phenolphtalinprobe nach Boas.[1])

Das Phenolphtalin ist als Blutreagens zuerst von französischer Seite empfohlen worden. *Boas* benutzt es in folgender Weise:

Das Reagens ist eine alkalische Lösung von Phenolphtalein, das durch Zink zu Phenolphtalin reduziert und nach *Boas* in folgender Weise hergestellt wird: 1 *g* Phenolphtalein und 25 *g* Kalium hydr. fus. werden in 100 *g* Wasser gelöst und 10 *g* Zinkpulver hinzugegeben. Die anfänglich rote Mischung wird unter beständigem Rühren und Schütteln so lange bei kleiner Flamme gekocht, bis vollständige Entfärbung eingetreten ist. Dann wird heiß filtriert. Zum Zwecke der besseren Haltbarkeit tut man gut, der Lösung etwas überschüssiges Zinkpulver zuzusetzen. Die Haltbarkeit ist unbegrenzt.

Der feste Kot wird mit Wasser bis zur Dünnflüssigkeit verrieben, etwas Eisessig zugesetzt, verrührt, Äther zugefügt, langsam im Reagenzglas geschwenkt, der Äther in ein reines Reagenzglas abgegossen, zum Äther 20 Tropfen des Reagens zugegeben (da das Reagens sich bei Berührung mit dem Sauerstoff der Luft leicht oxydiert, so ist es zweckmäßig, bevor man es zu dem Ätherextrakt zufügt, einige Tropfen ablaufen zu lassen), leicht geschüttelt und schließlich 3—4 Tropfen H_2O_2 zugesetzt. Hierbei wird bei Anwesenheit von Blutfarbstoff das Phenolphtalin zu Phenolphtalein oxydiert und, da es sich in alkalischer Lösung befindet, je nach dem stärkeren oder schwächeren Blutgehalt mehr oder weniger rosa bis intensiv rosarot gefärbt. Bei starkem Blutgehalt bleibt die Rotfärbung längere Zeit bestehen, bei schwächerem blaßt sie bereits nach einigen Minuten ab.

Bei hohem Blutgehalt der Fäzes ist der Zusatz von H_2O_2 nicht nötig. Bei geringem Blutgehalt dagegen ist der H_2O_2-Zusatz immer nötig. Das ist praktisch insofern von Bedeutung, als bei einer schon ohne Zusatz von H_2O_2 auftretenden Rotfärbung unbedingt ein starker Blutgehalt angenommen werden kann und umgekehrt. Ferner ist bei Ausführung der Probe zu beachten, daß das Ätherextrakt nicht zu sauer sein darf. Im Notfalle kann man nachträglich tropfenweise 10%ige Kalilauge zufügen.

Ihrer Schärfe nach steht die Phenolphtalinprobe zwischen der *Weber*schen Guajakprobe und der Benzidinprobe. Auch bei der Phenolphtalinprobe ist die Einhaltung mehrerer fleischfreier Tage unerläßlich.

Der Nachweis von Fermenten in den Fäzes.

Trypsin.

Hierzu eignen sich klare Fäzesextrakte, die nach *Frank* und *Schittenhelm*[2]) in folgender Weise hergestellt werden: Die Fäzes werden in einem

[1]) *J. Boas*, Die Phenolphtalinprobe als Reagens auf okkulte Blutungen des Magendarmkanales. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 2. S. 62—64. 1911.

[2]) *Fr. Frank* und *A. Schittenhelm*, Vorkommen und Nachweis von Trypsin und Erepsin im Magen-Darmkanal. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 8. H. 1. S. 246. 1910.

Verhältnisse von 1 : 2 bis 1 : 4 mit Wasser angerührt und durch gehärtetes Filtrierpapier auf der Nutsche mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe abfiltriert. Das so erhaltene Extrakt läßt man noch durch ein *Reichel*-Filter passieren. Die auf diese Weise erhaltene bakterienfreie Fäzeslösung stellt eine zumeist der Farbe der Fäzes entsprechend gefärbte klare Flüssigkeit dar, welche meist neutral oder schwach alkalisch, in seltenen Fällen schwach sauer reagiert. Man kann natürlich auch Extrakte herstellen in der Art, wie es früher (S. 345) beschrieben worden ist. Diese sind aber nicht bakterienfrei und müssen bei ihrer Verwendung mit Chloroform resp. Thymol versetzt werden. Das Extrakt wird mit konzentrierter Natriumbikarbonatlösung, wenn nötig, leicht alkalisch gemacht.

Am einfachsten gestaltet sich der Nachweis des Trypsins, wenn man zu kleinen Quantitäten des Extraktes im Reagenzglase eine Fibrinflocke oder ein mit Eiereiweiß oder Hammelserum (*Frank* und *Schittenhelm*[1]) gefülltes *Mett*sches Röhrchen gibt und für 24—36 Stunden bei 37° in den Brutofen stellt.

Trypsinnachweis durch das Plattenverfahren von *Müller-Schlecht*.[2])

Das Prinzip des Verfahrens ist folgendes: Bringt man zur Prüfung auf proteolytische Fermente kleine Tröpfchen des zu untersuchenden Materials auf die Oberfläche einer sogenannten *Löffler*-Serumplatte (Petrischale mit einer dicken Schicht erstarrten Blutserums) und hält die so beschickte Platte bei 50—60° im Brutschrank, so zeigt sich an Stelle jedes Tröpfchens bei Anwesenheit von Ferment eine nach und nach sich vergrößernde dellen- oder muldenförmige Einsenkung. Ist kein Ferment vorhanden, so bleibt die Dellenbildung aus.

Müller-Schlecht fanden, wenn sie mit Hilfe der Serumplatte den normalen Darminhalt prüften, eine bis zum untersten Dünndarm fortschreitende Zunahme der proteolytischen Fermentwirkung. Im Dickdarmstuhle finden sich nur noch Reste von Trypsin oder gar keines. Es ist also nötig, wenn man im menschlichen Kote Trypsin nachweisen will, einen Dünndarmstuhl zu erhalten. Dieser Dünndarmstuhl ist durch Abführmittel zu erzielen. Täuschungen können bei positivem Ausfalle der Plattenprobe dann vorkommen, wenn der Stuhl Eiter enthält, da man dann die Wirkung von proteolytischem Leukozytenferment nicht ausschließen kann. Um sich hierüber zu orientieren, genügt meist der makroskopische resp. mikroskopische Nachweis von Eiter. Eine hinreichend sichere Differenzierung gelingt durch eine einfache biologische Methode. Das Pankreastrypsin läßt sich nämlich von proteolytischem Leukozytenferment durch Zusatz des Blutserums von Kaltblütern oder Vögeln unterscheiden, insofern geringe Mengen des Kaltblüter- resp. Vogelserums durch ihren Gehalt an Antitrypsin die Dellenbildung durch den trypsinhaltigen Stuhl verhindern können. Gegenüber dem Leukozytenferment besitzt das Kaltblüterserum aber keine gröbere Hemmungskraft. Wird also eine ausgesprochene Dellenbildung schon bei Zusatz geringer Mengen von Kaltblüter- bzw. Vogelblutserum gehemmt, so handelt es sich um Pankreastrypsin. Blutbeimengungen zum

[1]) *Fr. Frank* und *A. Schittenhelm*, Vorkommen und Nachweis von Trypsin und Erepsin im Magen-Darmkanal. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 8. H. 1. S. 242. 1910.

[2]) *Ed. Müller* und *H. Schlecht*, Über die Prüfung der Pankreasfunktion durch Trypsinbestimmungen in den Fäzes. Med. Klinik. Nr. 16. S. 573—575 u. Nr. 17. S. 616—618. 1909.

Darminhalt können durch den Gehalt des Blutserums an Antitrypsin die Wirkung des Fäzestrypsins auf die Platte nur dann hemmen, wenn das Blut in so großen Mengen vorhanden ist, daß es schon makroskopisch ohne weiteres erkennbar ist.

Die Serumplatte wird nach *Müller* und *Schlecht* aus Rinderblutserum mit Zusatz von Traubenzuckerbouillon hergestellt.

Herstellung der Traubenzuckerbouillon: 1 *kg* mageres Rindfleisch, gewiegt und von Fett und Sehnen befreit, wird mit 2 *l* destilliertem Wasser im Emailletopf versetzt und mit einem starken Glasstab gut umgerührt und unter stetigem Umrühren $^1/_4$ Stunde auf dem Gasbrenner kochen gelassen. Der Topf mit Inhalt wird vor und nach dem Kochen gewogen und der Gewichtsverlust durch Zusatz von destilliertem Wasser ergänzt. Das Fleischwasser wird durch ein ausgespanntes Leinwandtuch in einen vorher abgewogenen Emailletopf koliert und der Rest durchgepreßt. Dann werden 1% Pepton. sicc. und 0·5% Kochsalz zugefügt und unter fleißigem Umrühren wiederum 10 Minuten gekocht. Der Topf wird durch Deckel verschlossen und im Kaltwasserbad abgekühlt. Dann wird durch Filtriertuch filtriert (ganz klar!), in gesäuberten Bierflaschen mit Patentverschluß abgefüllt und 2 Stunden im Dampftopf sterilisiert. Aus der Fleischwasservorratslösung wird neutrale Bouillon bereitet. Dazu wird das Fleischwasser neutralisiert (auf 1 *l* etwa 20 cm^3 Normalnatronlauge), im Wasserbade gründlich aufgekocht und durch ein doppeltes Filter filtriert. Zu 100 cm^3 dieser neutralen Bouillon kommen 10 cm^3 10%iger Traubenzuckerlösung. Die Mischung wird im Wasserbade gekocht und mit Normalnatronlauge sorgfältig neutralisiert.

Herstellung der Platte: 2 Teile Rinderblutserum werden mit 1 Teil Traubenzuckerbouillon versetzt und sorgfältig geschüttelt. Man erhält auf diese Weise das „*Löffler*-Serum", mit dem man die „*Löffler*-Platten" derart gießt, daß in den zuvor sterilisierten Petrischalen eine dicke Schicht möglichst undurchsichtigen weißgelblichen Serums in dem auf 85—90° eingestellten Sterilisator erstarrt. Nach 3—4stündigem Verweilen im Sterilisator läßt man das erstarrte Serum langsam abkühlen. Nach Abnahme des Glasdeckels wird das Kondenswasser durch Umdrehen der Platten entfernt. Wiederholte Sterilisation ist nicht nötig. Die Serumplatte ist dann gelungen, wenn sie von erheblicher Dicke und vollkommen glatter trockener Oberfläche ist, so daß die ausgesäten Tröpfchen nicht auslaufen können. Man läßt deshalb die sterilisierten Platten einige Tage ablagern oder nach Wegnahme des Glasdeckels bei 55—60° einige Zeit nachtrocknen.

Der Trypsinnachweis mittelst des Plattenverfahrens gestaltet sich nun folgendermaßen:

Die zu untersuchende Person erhält früh nüchtern einen hohen Einlauf oder eine Glyzerinspritze zur Reinigung der untersten Darmabschnitte. Nach erfolgtem Stuhlgang wird eine Probemahlzeit (150 *g* Fleisch und 150 *g* Kartoffelbrei) verabreicht. Eine halbe Stunde danach Darreichung eines Abführmittels (0·2—0·3 Kalomel oder 0·5 Purgen, eventuell 0·2 Kalomel mit 0·2—0·3 Purgen zusammen). Der damit erzielte meist dünnflüssige Dünndarmstuhl wird zum qualitativen Nachweis des Trypsins so verwendet, daß man kleine Stuhltröpfchen mit einer Platinöse oder einem Glasstäbchen auf eine abgeteilte Fläche der Serumplatte bringt und dieselbe 24 Stunden bei 50—60° im Brutschrank hält. Die Anwesenheit von Trypsin zeigt sich durch Bildung deutlicher Dellen. Die Dellenbildung tritt bei normalem Fermentgehalt meist sehr rasch in kaum einer halben Stunde ein. Fehlt nach 24 Stunden jede Dellenbildung, so ist kein wirksames Trypsin vorhanden.

Ist der Stuhl zu dickbreiig, so verreibt man ihn mit Glyzerinwasser. Wenn nötig, wird mit Sodalösung alkalisiert, bis Lackmuspapier eben eine

alkalische Reaktion zeigt. Scheut man sich vor der Verabreichung von Abführmitteln, so kann man auch den spontan entleerten Stuhlgang nach der Verreibung mit Glyzerinwasser und Alkalisierung in der beschriebenen Weise verwenden. Allerdings ist dann die Dellenbildung meist eine recht geringe.

Zur genaueren quantitativen Bestimmung des Trypsins sind dünnflüssige Stühle nötig. Diese werden in einem Porzellanmörser aufs sorgfältigste verrieben. Alsdann werden mit einer Meßpipette Verdünnungen des verriebenen unfiltrierten Stuhles mit Glyzerinwasser hergestellt. Man macht diese Verdünnungen am zweckmäßigsten in Porzellanschälchen oder Uhrgläschen oder auf Porzellanplatten, in denen eine Anzahl Vertiefungen enthalten sind. *Müller* und *Schlecht* empfehlen, was den Grad der Verdünnungen betrifft, die Stuhlverreibung 5-, 10-, 20-, 50-, 100- und 200fach mit Glyzerinwasser zu verdünnen. Die Serumplatte wird in 8 numerierte Abschnitte durch Tintenstriche eingeteilt und die einzelnen Abschnitte mit Tinte numeriert. In das erste Feld kommt dann in Gestalt von 4 bis 6 Tröpfchen die unverdünnte Stuhlverreibung, in die nächsten 6 Felder nacheinander die obenerwähnten Verdünnungen mit Glyzerinwasser. Vor der Aussaat wird jede Verdünnung nochmals sorgfältig verrieben. Ist man der tadellosen Herstellung einer Serumplatte nicht sicher, so kommen in das 8. Feld Tröpfchen einer wirksamen künstlichen Trypsinlösung. Die so beschickte Platte wird auf 24 Stunden bei 50—60° in den Brutschrank gestellt. Ist ein solcher nicht zur Verfügung, so kann man die Platte nach Zusatz von Chloroform oder Thymollösung zu der Stuhlverreibung bei 37° halten. Das letzte Ablesen der Resultate erfolgt erst nach 24 Stunden.

Kniaskof [1]) empfiehlt neuerdings, da das Serum ein immerhin ziemlich teures Material und nicht immer zu beschaffen ist und da die Serumplatten leicht verderben, zur Trypsinprobe Platten zu gießen mit Gelatine, welche mit Formalin vorbehandelt ist. Eine derartig behandelte Gelatine verflüssigt sich bei höheren Temperaturen nicht. Ihre Empfindlichkeit gegen Trypsin bleibt aber erhalten. Diese Platten werden folgendermaßen hergestellt:

10—15%ige Gelatine wird auf einem Wasserbade in destilliertem Wasser aufgelöst, neutralisiert, filtriert, dann in Petrischalen bis zur Bildung einer gleichmäßigen Schicht in ca $^1/_3$ *cm* Höhe ausgegossen. Man läßt die Gelatine erstarren und gießt auf ihre Oberfläche eine 10%ige Formalinlösung. Nach 12—24 Stunden wird das Formalin entfernt; darauf werden die Schalen mit der erstarrten Gelatineschicht während $^1/_2$ bis 1 Stunde mit fließendem Wasser abgespült, bis der Formalingeruch verschwunden ist. Die Gelatineoberfläche wird dann vorsichtig mittelst Fließpapieres abgetrocknet, worauf die Platten fertig sind. Sie müssen vor Austrocknen geschützt werden.

Bei diesen Platten sind ganz unbedeutende Vertiefungen bei Einwirkung schwacher Trypsinlösungen infolge der Durchsichtigkeit der Gelatine nicht ganz deutlich erkennbar. Sie werden aber deutlicher, wenn die Gelatine mit einem Farbstoff versetzt wird. Zu diesem Zwecke empfiehlt *Kniaskof* die *Burri*sche Tusche. Man setzt der flüssigen Gelatine vor Füllung der Petrischalen soviel Tropfen Tusche zu, bis die Gelatine rauchgrau aussieht. Nach der Einwirkung der Trypsinlösung wird die Gelatineoberfläche mit Wasser abgespült. Es treten dann die kleinen Vertiefungen auf dem dunklen Grunde der gefärbten Gelatine deutlich hervor.

[1]) *Kniaskof*, Platten für die Trypsinprobe. Med. Klinik. Nr. 3. S. 108. 1911.

Die Kapselmethode von *Müller* und *Schlecht*.[1])

Die Kapselmethode ist eine Modifikation der *Sahli*schen Glutoidkapselprobe, bei der die Kapseln bekanntlich mit Jodoform gefüllt sind. *Müller* und *Schlecht* benutzen hierzu die nach Angaben von *Rumpel* hergestellten Capsulae geloduratae. Es sind dies Gelatinekapseln, die in alkoholischer Formalinlösung so gehärtet sind, daß sie nur durch das Pankreastrypsin rasch gelöst werden. Sie sind mit fein pulverisiertem Holzkohlenstaub gefüllt und sind als Capsulae geloduratae c. carb. lign. 0·3 von der Firma *G. Pohl* in Schönbaum bei Danzig zu beziehen.

Für die Kapselprobe muß in der oben geschilderten Weise ein Dünndarmstuhl geschaffen werden. Etwa 10—15 cm^3 der möglichst dünnflüssigen Stuhlprobe werden unter Zusatz von Chloroform oder einigen Thymolkristallen in ein kleines Glasgefäß gefüllt, welches so weit sein muß, daß die Kapsel darin frei schwimmen kann. Der Stuhl darf nicht filtriert werden. Es genügt, etwaige gröbere Brocken sorgfältig zu verreiben. Wenn nötig, wird mit Sodalösung alkalisiert. Die in das Glasgefäß gefüllte Stuhlprobe wird nun mit einer Geloduratkapsel beschickt und bei 37° im Brutofen gehalten. Die Temperatur von 37° darf nicht erheblich überschritten werden, weil sonst die Kapsel sich spontan lösen kann. Der Moment der Kapsellösung zeigt sich dadurch an, daß der austretende Kohlenstaub die Flüssigkeit schwarz färbt. Ist innerhalb 24 Stunden die Kapsel ungelöst, so ist kein Trypsin im Stuhl enthalten. Bei normalem Trypsingehalt ist die Kapsel in $^1/_2$—1 Stunde gelöst. Je weniger Trypsingehalt vorhanden ist, desto länger dauert die Lösung. Es läßt sich also schon durch Feststellung der Lösungszeit eine annähernde quantitative Abschätzung des Trypsingehaltes ermöglichen. Um genauere quantitative Angaben zu machen, verfährt man wie beim Plattenverfahren, indem man in derselben Weise, wie oben geschildert, mit 10%igem Glyzerinwasser verdünnt und in jede der Verdünnungen eine Kapsel legt.

Die Kaseinmethode von *Gross*[2])-*Koslowsky*.[3])

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß das Kasein, in Alkali leicht löslich, im Gegensatz zu seinen Verdauungsprodukten bei Essigsäurezusatz leicht ausfällt. Zur Stuhluntersuchung stellt man sich am besten eine $^1/_2$‰ige Lösung des Kaseins her, indem man 0·5 g des Caseinum purissimum *Grübler* in 1 l einer 1‰igen Sodalösung unter Erhitzen löst. Die Fäzes werden in einer Reibeschale mit der dreifachen Menge 1‰iger Sodalösung zu einer ganz gleichmäßigen Masse aufgeschwemmt und so

[1]) *Ed. Müller* und *H. Schlecht*, Über die Prüfung der Pankreasfunktion durch Trypsinbestimmungen in den Fäzes. Med. Klinik. Nr. 17. S. 617. 1909.

[2]) *O. Gross*, Zur Funktionsprüfung des Pankreas. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 16. S. 706—708. 1909.

[3]) *S. Koslowsky*, Der Nachweis des Trypsins in den Fäzes und seine diagnostische Bedeutung (Untersuchung mit der Kaseinmethode von *Gross*). I.-D. Greifswald 1909.

lange filtriert, bis man ein klares gelbgefärbtes Filtrat erhält, was gewöhnlich rasch der Fall ist. Bekommt man kein ganz klares Filtrat, so läßt man die Trübung absetzen und benutzt die darüberstehende klare Flüssigkeit. In ein kleines Kölbchen bringt man 100 cm^3 der Kaseinlösung und setzt 10 cm^3 der Kotaufschwemmung zu, bringt die Mischung in den Thermostaten bei 38—40° C und sieht an kleinen, von Zeit zu Zeit entnommenen Proben nach, wenn auf Zusatz von 1%iger Essigsäure eine Trübung nicht mehr auftritt, d. h. wenn alles Kasein verdaut ist.

Es hat sich gezeigt, daß in allen Fällen, bei denen es sich nicht um eine Erkrankung des Pankreas oder einen Verschluß der Pankreasausführungsgänge handelt, Trypsin in den Fäzes nachzuweisen ist. Um einen möglichst starken Trypsingehalt der Fäzes zu erzielen, ist eine stark eiweißhaltige Nahrung zu verabreichen, eventuell kann auch ein mildes Abführmittel gegeben werden. Die Verdauungszeit des Kaseins schwankt zwischen 8 und 15 Stunden, gewöhnlich beträgt sie 12—14 Stunden. Durch geeignete Verdünnungen der Fäzes kann man auch annähernd quantitative Schlüsse ziehen.

Die Seidenpeptonmethode.

Dieselbe ist von *Abderhalden*[1]) für den Nachweis peptolytischer Fermente im Darmkanal eingeführt worden. Man löst 1/2 *g* des Seidenpeptons[2]) in 1 cm^3 des nach *Frank* und *Schittenhelm*[3]) hergestellten Fäzesextraktes auf, wobei sofort zu alkalisieren ist. Das Gemisch wird im Brutofen bei 37—40° 1—3 Tage gehalten. Dabei fällt, wenn reichlich Ferment vorhanden ist, Tyrosin in kristallinischer Form aus, erkennbar makroskopisch oder nach Sedimentieren im Sediment mikroskopisch als schöne in Büschelform angeordnete Nadeln. Ist nichts ausgefallen, so kommt die Lösung für einige Tage in den Eisschrank, wobei dann zuweilen das Tyrosin erst ausfällt. Bleibt die Lösung dauernd klar, so ist kein Ferment vorhanden.

Die Seidenpeptonmethode kann auch bei Anwesenheit von Erepsin positiv ausfallen.

Die Kernprobe von *Ad. Schmidt.*[4])

Schmidt fand, daß die Kerne der Zellen im Gegensatz zum Bindegewebe nur vom Pankreassekret, nicht aber vom Magensaft verdaut werden.

[1]) *E. Abderhalden* und *Fl. Medigreceanu*, Über das Vorkommen von peptolytischen Fermenten im Mageninhalte und ihr Nachweis. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **57**. S. 317. 1908, ferner *E. Abderhalden* und *A. Schittenhelm*, Über den Nachweis peptolytischer Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **61**. S. 421. 1909.

[2]) Über die Darstellung des Seidenpeptons vergl. *E. Abderhalden* und *Eugen Steinbeck*, Beitrag zur Kenntnis der Wirkung des Pepsins und der Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **68**. S. 293. 1910.

[3]) *Fr. Frank* und *A. Schittenhelm*, Vorkommen und Nachweis von Trypsin und Erepsin im Magendarmkanal. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. Bd. 8. H. 1. S. 242 und 246. 1910.

[4]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. 2. Aufl. S. 35—36. 1908.

Wenn also unverdaute Gewebskerne in den Fäzes wieder erscheinen, so kann man daraus nach *Schmidt* den sicheren Schluß auf ungenügende Funktion des Pankreas ziehen.

Die Probe wird so angestellt, daß man die zu untersuchende Person einen kleinen Fleischwürfel, der sich in einem Beutelchen von Seidengaze befindet, verschlucken läßt, und zwar mehrere Tage hintereinander mittags. Die Beutelchen werden im Kote leicht wiedergefunden, besonders wenn man den zuschnürenden Seidenfaden recht lang läßt, und es wird dann in dem in dem Säckchen enthaltenen Fleischreste entweder frisch mit Essigsäure oder Methylenblaulösung oder nach vorausgegangener Härtung in gefärbten Schnitten auf die Anwesenheit von Kernen gesucht.

Die Fleischwürfel werden so hergestellt, daß frisches Fleisch in Würfel von ca. 1/2 *cm* Seitenlänge geschnitten und in Alkohol aufbewahrt wird. Nach der Härtung werden die Würfel in kleine Gazebeutelchen getan und wieder in Alkohol aufbewahrt. Vor dem Gebrauche sind die gefüllten Beutel mehrere Stunden zu entwässern.

Gegenüber mehreren Einwänden, die in neuerer Zeit gegen diese Probe gemacht worden sind (*Brugsch*[1]), *Hesse*[2]) und die sich darauf gründen, daß die Kerne schon im Magensaft gelöst werden, hat *Strauch*[3]) neuerdings bei Verwendung natürlicher Verdauungssäfte gezeigt, daß die Zellkerne nur vom Pankreassaft gelöst werden, daß also die Grundlagen der *Schmidt*schen Probe richtig sind und daß die Probe mit Recht zum Nachweis von Pankreasferment verwendet wird. Zu dem gleichen Resultat ist nach einer Mitteilung von *Ad. Schmidt*[4]) vor kurzem *Kashiwado* gelangt, der fand, daß weder Magensaft noch Darmsaft die Kerne in einem für den Ausfall der Probe wesentlichen Grade angreifen. Dagegen löst reiner Pankreassaft — und zwar auch der nicht aktivierte — die Kerne schnell.

Kashiwado hat die *Schmidt*sche Kernprobe in folgender Weise vereinfacht: Die Kerne der Thymusdrüse lassen sich durch Verdauung des Thymusgewebes im Magensaft leicht isolieren. Die isolierten Kerne werden mit Alkohol und Äther gewaschen, mit Alaun-Hämatoxylin gefärbt, getrocknet und mit Lykopodium vermischt in einer Oblate gereicht. Im nächsten oder übernächsten Stuhl werden die Stellen, an denen Lykopodium vorhanden ist, mikroskopiert, und man erkennt dann die gefärbten Kerne, wenn sie unverdaut geblieben sind, leicht wieder. Sind sie verdaut, so bleibt nur das auffällige Lykopodium zurück.

Diese Modifikation gibt nach *Ad. Schmidts* bisherigen Erfahrungen dieselben Resultate wie die ursprüngliche Kernprobe.

[1]) *Th. Brugsch*, Experimentelle Beiträge zur funktionellen Darmdiagnostik. Zeitschr. f. experim. Path. u. Therapie. Bd. **6**. H. 2. S. 361—362. 1909.

[2]) *A. Hesse*, Zur Bewertung der *Schmidt*schen Kernprobe. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. Bd. 7. H. 1. S. 91—93. Vgl. ferner *N. van Westenrijk*, Die Kernprobe von Prof. *Ad. Schmidt*. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therapie. Bd. 8. H. 2. S. 353—357. 1910.

[3]) *Frdr. Strauch*, Die Grundlage der *Ad. Schmidt*schen Kernprobe. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **101**. S. 128—136. 1910.

[4]) *Ad. Schmidt*, Diskussionsbemerkung zu dem Vortrag von *Winternitz*, Über eine neue Methode zur Funktionsprüfung des Pankreas. 28. deutscher Kongreß für innere Medizin. Wiesbaden. 21. April 1911.

Erepsin.

Erepsin ist im menschlichen Dünndarminhalt und in den Fäzes mit Sicherheit nachgewiesen worden.

Zum Nachweis in den Fäzes werden die Eigenschaften des Erepsins benutzt, durch die es sich vom Trypsin unterscheidet, daß es nämlich, wie *Abderhalden*[1]) und seine Mitarbeiter nachgewiesen haben, gewisse Polypeptide, z. B. Glyzyl-glyzin spaltet, was Trypsin nicht tut, und daß es ferner natives Eiweiß (Fibrinflocken, *Mett*sches Röhrchen) nicht angreift. Störend wirkt aber bei der Differenzierung zwischen Trypsin und Erepsin der Umstand, daß beide Kasein spalten und die Seidenpeptonreaktion geben. Peptone werden vom Erepsin schnell gespalten.

Die zu zweit genannte Eigenschaft des Erepsins, natives Eiweiß nicht anzugreifen, ist zum Nachweis des Erepsins so zu verwerten, daß auf Anwesenheit von Erepsin geschlossen werden kann, wenn Fibrinflocke und *Mett*sche Röhrchen unangegriffen bleiben bei gleichzeitiger Lösung von Kasein und bei positiver Seidenpeptonprobe.

Nach *Brugsch*[2]) empfiehlt es sich, zu 5 *cm*³ einer 1‰igen *Witte*-Peptonlösung 1 *cm*³ Fäzesextrakt zuzusetzen und das Reagenzglas mit dem Gemisch 40—72 Stunden bei 37° zu halten. Ist dann die vorher positive Biuretreaktion negativ geworden, so spricht dies für das Vorhandensein von Erepsin, wenn es nicht gelingt, Trypsin nachzuweisen.

Frank und *Schittenhelm*[3]) raten wegen der dem Trypsin und Erepsin gemeinsamen Eigenschaft, Kasein zu verdauen, die Kaseinmethode von *Gross* zum Nachweis des Trypsins in den Fäzes nicht zu verwerten oder nur in Kombination mit anderen Methoden. Indessen scheint es nach den neuesten Untersuchungen von *Brugsch* und *Masuda*[4]), als ob die kaseolytische Wirkung der Fäzesextrakte in der Hauptsache auf das Trypsin zu beziehen ist. Die geringere kaseolytische Wirkung des Erepsins und Bacterium coli-Extraktes kann bei der doch immerhin großen Verdünnung der Fäzesextrakte unberücksichtigt bleiben.

Diastase.

Der Nachweis der Diastase geschieht so, daß der verzuckernde Einfluß der vorhandenen Diastase auf eine Stärkelösung geprüft wird, wobei Jodlösung als Indikator dient.

---

[1]) Vgl. hierzu *Emil Abderhalden* und *Y. Teruuchi*, Studien über die proteolytische Wirkung der Preßsäfte einiger tierischer Organe sowie des Darmsaftes. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. **49**. S. 1. 1906.

[2]) *Th. Brugsch*, Experimentelle Beiträge zur funktionellen Darmdiagnostik. Zeitschrift f. exper. Path. u. Therapie. Bd. **6**. H. 2. S. 359. 1909.

[3]) *Fr. Frank* und *A. Schittenhelm*, Vorkommen und Nachweis von Trypsin und Erepsin im Magendarmkanal. Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie. Bd. **8**. H. 1. S. 253. 1910.

[4]) *Th. Brugsch* und *N. Masuda*, Über das Verhalten des Dünndarmsaftes und -Extraktes, ferner des Extraktes einiger Bazillen (Koli, Streptokokken) gegenüber Kasein, Lezithin, Amylum. Ein Beitrag zur funktionell-diagnostischen Prüfung der Fäzes auf Fermente des Pankreas. Zeitschr. f. exper. Path. u. Therapie. Bd. **8**. H. 3. S. 617—623. 1911.

Die Methode wird nach *Wohlgemuth*[1, 2]) in folgender Weise ausgeführt: Eine auf der Handwage abgewogene Menge von 5 *g* frischem Kot wird in einer Reibeschale mit 20 *cm*³ einer 1%igen Kochsalzlösung verrieben, und zwar in der Weise, daß man von dem abgemessenen Quantum Kochsalzlösung erst ein paar Kubikzentimeter zufügt, so lange verreibt, bis man einen vollkommen homogenen Brei hat, wieder etwas Kochsalzlösung zufügt und verreibt und so weiter verfährt, bis man die gesamte Flüssigkeitsmenge mit dem Kote verrieben hat. Dann läßt man noch 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, rührt in der Zwischenzeit häufig um und verteilt nun den dünnen flüssigen Brei in gleichmäßiger Weise (je 10 *cm*³) auf 2 Zentrifugierröhrchen, die genau gegeneinander tariert sind und eine Graduierung tragen. Dann wird so lange zentrifugiert, bis die festen Bestandteile sich abgesetzt haben, was innerhalb 5—10 Minuten erreicht ist, und nun die Höhe des festen Rückstandes und der Flüssigkeitsmenge an der Graduierung der beiden Röhrchen abgelesen und notiert. Hat man vor der Übertragung des Breies auf die Zentrifugierröhrchen noch einmal gründlichst durchgerührt, so wird man nach Beendigung des Zentrifugierens finden, daß der Rückstand in beiden Röhrchen die gleiche Höhe einnimmt. Glaubt man, daß der Rückstand bei weiterem Zentrifugieren noch mehr zusammensinken würde, so läßt man die Zentrifuge noch weitere 5 Minuten laufen. Bei einer elektrischen Zentrifuge genügt es, die Gläschen höchstens 15 Minuten lang in Betrieb zu halten.

Alsdann gießt man das überstehende fermenthaltige Fäzesextrakt ab und bestimmt die Diastase mittelst eines Reihenversuchs. Zu diesem Zwecke benutzt man 9 Reagenzgläschen, auf die man das Ferment verteilt. Die Fermentverteilung nimmt man so vor, daß man die ersten drei Gläschen mit 1·0, 0·5 und 0·25 *cm*³ des unverdünnten Fäzesextraktes beschickt und weiterhin so fortfährt, daß jedes Gläschen die Hälfte von dem vorhergehenden erhält. Das erreicht man am bequemsten, wenn man mit der 8- respektive 64fachen Verdünnung des ursprünglichen Fäzesextraktes arbeitet. Glas 4, 5 und 6 erhalten dann 1·0, 0·5 und 0·25 *cm*³ der 8fachen Extraktverdünnung, Glas 7, 8 und 9 erhalten 1·0, 0·5 und 0·25 *cm*³ der 64fachen Extraktverdünnung, so daß die einzelnen Gläser folgende Fermentmengen enthalten:

Glas 1	Glas 2	Glas 3
1·0	0·5	0·25
Glas 4	Glas 5	Glas 6
0·125	0·0625	0·0312
Glas 7	Glas 8	Glas 9
0·0156	0·0078	0·0039.

[1]) *J. Wohlgemuth*, Über eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des diastatischen Fermentes. Biochem. Zeitschr. Bd. 9. H. 1 u. 2. S. 1—9. 1908.

[2]) *J. Wohlgemuth*, Beitrag zur funktionellen Diagnostik des Pankreas. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 3. S. 92—95. 1910.

Die Verdünnung macht man sämtlich mit 1%iger Kochsalzlösung und ergänzt die fehlende Menge in den einzelnen Gläschen mit derselben Lösung, um überall gleichmäßige Kochsalzkonzentration zu erhalten. Dann kommen zu jeder Fermentprobe 5 *cm*³ 1%iger Stärkelösung. Die Gläschen werden sodann mit einem Kork oder Wattestopfen fest geschlossen und auf 24 Stunden in den Brutschrank bei 38° gestellt. Nach Ablauf der Frist werden sie herausgenommen, mit kaltem Leitungswasser bis etwa 1 Finger breit vom Rande aufgefüllt, mit je 1 Tropfen $\frac{1}{10}$-Normaljodlösung versetzt und nun die unterste Grenze der Wirksamkeit (limes) bestimmt, d. h. dasjenige Gläschen, in dem zum ersten Male ein blauer Farbenton auftritt.

Angenommen, Glas 7 sei als limes zu bezeichnen, so würde Glas 6 mit 0·0312 Extrakt dasjenige Glas sein, in dem sämtliche Stärke mindestens bis zum Dextrin abgebaut ist. Aus diesem Glase berechnet sich die Größe des Fermentes in der Weise, daß die Anzahl Kubikzentimeter einer 1%igen Stärkelösung bestimmt werden, die durch 1 *cm*³ der Fermentlösung in der für den Versuch angewandten Zeit bis zum Dextrin total abgebaut wird. Es ergibt sich folgende rechnerische Überlegung:

0·0312 Extrakt bauen in 24 Stunden bei 38° 5 *cm*³ 1%iger Stärkelösung ab.

1·0 Extrakt baut in 24 Stunden bei 38° 160·3 *cm*³ 1%iger Stärkelösung ab.

Die diastatische Kraft eines Kubikzentimeters Extrakt aus Fäzes bezeichnet *Wohlgemuth* mit Df. Im angenommenen Beispiele würde also Df = 160·3 sein, d. h. die diastatische Kraft beträgt 160·3 Diastaseeinheiten.

Nun muß man weiter in Rechnung setzen die Menge des Rückstandes, die in 5 *g* Kot enthalten ist. Angenommen, es wären beim Zentrifugieren für den Rückstand 2·5 *cm*³ und für die Menge des Extraktes 7·5 *cm*³ gefunden worden, so würde 1 *cm*³ Rückstand entsprechen $\frac{7{\cdot}5}{2{\cdot}5}$ *cm*³ Extrakt = 3 *cm*³ Extrakt. Da nun 1 *cm*³ Extrakt = 160·3 Fermenteinheiten ist, so entspricht 1 *cm*³ Rückstand 3 × 160·3 = 480·9 Fermenteinheiten. Demnach würde sich aus diesem Beispiel für die Diastasemenge im Kot der Wert ergeben: $Df^{38^\circ}_{24\,h}$ = 480·9, wobei $Df^{38^\circ}_{24\,h}$ bedeuten würde die Diastasekonzentration in 1 *cm*³ Kotrückstand unter gleichzeitiger Angabe der Zeit und der Temperatur, die bei Ausführung des Versuches zur Verwendung kamen.

Will man nun noch die Diastasemenge für den Gesamtkot berechnen, so braucht man nur das Gewicht in Beziehung zu setzen zu der Menge des Ausgangsmaterials und zu dem Werte, den man für $Df^{38^\circ}_{24\,h}$ gefunden hat.

In dünnen Fäzes ist die Diastasemenge viel größer als in festen Fäzes, dabei so gleichmäßig verteilt, daß Kontrollbestimmungen sich erübrigen. Diastasewerte von 470

bis 500 sind nach *Wohlgemuth* und *Wynhausen*[1]) Durchschnittswerte. Um möglichst große Diastasemengen im Stuhle zu erhalten, muß eine geeignete Diät gegeben werden. Die Diät muß bewirken, daß das Pankreas möglichst viel Sekret liefert und daß der Stuhl möglichst homogen und alkalisch ist, da die Diastase in saurem Medium unwirksam ist. Es soll deshalb eine gemischte Kost mit wesentlicher Einschränkung der Kohlehydrate gegeben werden (Milch mit Tee und Kaffee, Bouillon, Schabefleisch von Kalb und Rind, Eier, weißer Käse, Weißbrot, Butter). Diese Diät wird 2 Tage lang gegeben und erst am zweiten und dritten Tage der Stuhl auf Diastase untersucht. Am Tage vor der Diät und an den beiden nächsten Tagen wird abends ein mildes Laxans (Rhabarber, Sagrada, Kurella) gegeben.

Die zum Versuche nötige Stärkelösung wird aus der löslichen Stärke von *Kahlbaum* hergestellt. Die Bereitung der 1°/₀igen Lösung geschieht so, daß man die genau abgewogene Menge Stärke in das entsprechende Quantum kalten destillierten Wassers einträgt und so lange rührt, bis sich eine gleichmäßige Suspension gebildet hat. Dann wird die Mischung in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade unter stetem Umrühren erwärmt, bis sie sich aufhellt, was innerhalb 8—10 Minuten erreicht ist. Auf diese Weise erhält man eine ganz homogene, leicht opake Lösung. Dieselbe muß natürlich erst stark gekühlt werden, bevor sie zum Versuch verwendet wird. Sie hält sich zwar mehrere Tage, doch ist es zweckmäßig, möglichst frische Lösungen zu verwenden.

Zuweilen ist es schwierig, dasjenige Gläschen zu bestimmen, in dem man den ersten blauen Farbenton deutlich wahrnimmt. Man begegnet manchmal Röhrchen, in denen neben einem starken Rot (Erythrodextrin) ein leichter blauer Farbenton vorhanden ist. Wenn man schwankt, ob dieses Röhrchen schon als unterste Grenze aufzufassen ist, so gibt man zweckmäßig noch einen Tropfen Jodlösung in dieses Gläschen und beobachtet beim Umschütteln, ob der blaue Farbenton bestehen bleibt oder durch eine rotbraune Färbung verdrängt wird.

Gleichzeitige Ausführung der Kaseinmethode (Gross) und der Diastasemethode (Wohlgemuth).

Wenn es darauf ankommt, beide Fermente gleichzeitig zu bestimmen, so verfährt *Wynhausen*[2]) praktischerweise folgendermaßen: Er benutzt ein Fäzesfiltrat und führt zwei Reihenversuche mit je 12 Gläschen, die in zwei kleinen Regalen untergebracht sind, aus. Die Gläschen beschickt er in folgender Weise:

Je 2 Gläschen mit 0·25 und 0·1 *cm*³ unverdünntem Filtrat;

je 5 Gläschen mit 0·6, 0·4, 0·25, 0·16 und 0·1 *cm*³ des 10fach verdünnten Filtrats;

je 3 Gläschen mit 0·05, 0·25 und 0·1 *cm*³ des 100fach verdünnten Filtrats;

je 2 Gläschen mit 0·5 und 0·25 *cm*³ des 1000fach verdünnten Filtrats.

Die 12 Gläschen der einen Reihe werden mit je 5 *cm*³ 1°/₀iger Stärkelösung, die 12 der anderen Reihe mit je 5 *cm*³ 1°/₀₀iger Kaseinlösung beschickt und die Proben in der obigen Weise weitergeführt. Die Umsetzung von 1 *cm*³ 1°/₀₀iger Kaseinlösung durch 1 *cm*³ Filtrat = tryptische Fermenteinheit, wovon sich normalerweise immer mehr als 200 Einheiten finden.

[1]) *O. J. Wynhausen*, Zur quantitativen Funktionsprüfung des Pankreas. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 30. S. 1406—1407. 1909.

[2]) *O. J. Wynhausen*, l. c. S. 1407.

Der Nachweis anorganischer Bestandteile.

Der Nachweis erfolgt durch Analyse der Fäzesasche.

Quantitative Bestimmung der Fäzesasche.

Zur Veraschung wird ganz trockener und fein pulverisierter Kot verwendet. Ein abgewogenes Quantum davon wird im Platin- oder Porzellantiegel vorsichtig erhitzt, zunächst bei Rotglut verkohlt und schließlich bis zum völligen Weißwerden der Asche geglüht. Der Tiegel wird zur Abkühlung im Exsikkator aufbewahrt und dann gewogen.

Analyse der Fäzesasche.

Hoppe-Seyler [1]) hat darauf aufmerksam gemacht, daß bei der obigen Veraschung ein Teil der hierbei nachweisbaren Schwefelsäure und Phosphorsäure nicht als anorganisches Salz im Untersuchungsmaterial enthalten zu sein braucht, sondern erst während der Veraschung aus dem organisch gebundenen Schwefel der Proteinstoffe entstanden bzw. aus den Phosphorsäure enthaltenden Lezithinen und phosphorhaltigen Proteiden abgespalten werden kann; ferner, daß Kohlensäure und Salzsäure während der Veraschung durch Schwefelsäure und Phosphorsäure ausgetrieben werden können. Um diese Fehlerquellen nach Möglichkeit zu vermeiden, verrührt man die Fäzes nach *Hoppe-Seyler* [2]) mit einem großen Überschuß von Alkohol, filtriert und zieht den Rückstand zunächst mit verdünnter Essigsäure und darauf mit verdünnter Salzsäure aus. Man erhält auf diese Weise eine alkoholische, eine essigsaure und eine salzsaure Lösung.

Die alkoholische und essigsaure Lösung werden vereinigt, eingedampft und verascht.[3]) Hierzu bringt man den beim Eindampfen verbleibenden Rückstand in eine Platinschale, welche mindestens das sechsfache Volumen der zu veraschenden Substanz faßt. Ist diese Substanz spröde, knistert und zerspringt sie beim Erhitzen, so bedeckt man zunächst die Schale und erhitzt bedeckt so lange, als man noch Knistern hört. Dann entfernt man den Deckel. Das Erhitzen ist nur langsam zu steigern, um dem Wasser und gasförmigen Destillationsprodukten hinreichend Zeit zum ruhigen Entweichen zu lassen, denn bei zu rapidem Entweichen der Gase können Substanzpartikelchen mit fortgerissen werden und Verluste an Asche bedingen. Man erhitzt in dieser Weise höchstens bis zu beginnender Rotglut und erhält bei dieser Temperatur, bis keine Dämpfe oder Nebel mehr entweichen und die Kohle fest und unbeweglich geworden ist. Man läßt dann erkalten, übergießt die erkaltete Kohle mit ein wenig Wasser, verreibt sie unter demselben möglichst fein, erhitzt nach Zusatz von noch mehr Wasser zum Sieden und filtriert durch ein aschefreies Filter, wel-

[1]) *F. Hoppe-Seyler* und *H. Thierfelder*, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 7. Aufl. Berlin 1903. § 541. S. 471.

[2]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, l. c. § 687. S. 553.

[3]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, l. c. § 426. S. 391.

ches mit heißem Wasser genügend ausgewaschen wird. Platinschale, Filter und Kohle werden gut im Luftbade getrocknet, die trockenen Substanzen mit dem Filter in der Schale abermals bei schwacher Rotglut erhitzt, nach dem Erkalten wieder mit Wasser verrieben und in der obigen Weise behandelt. Das Filtrat wird mit dem ersten vereinigt. Nun werden Schale, Filter und Kohle wieder getrocknet, allmählich bis zum heftigen Glühen erhitzt und so lange im Glühen erhalten, bis die Kohle völlig oder bis auf geringe Spuren verschwunden ist. Da die Kohle stets noch Spuren löslicher Salze zurückhält, so ist auch diese Asche noch mit Wasser zu extrahieren, das Filtrat mit den vorherigen zu vereinigen und die ganze Flüssigkeitsmenge auf dem Wasserbade einzuengen. Die im Wasser unlöslichen Aschebestandteile werden nun mit verdünnter Salzsäure erwärmt, und wenn hierbei Eisenoxyd zurückbleiben sollte, bis zur völligen Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade digeriert.

Man erhält auf diese Weise einen wässerigen und einen salzsauren Auszug der Asche.

In dem wässerigen Auszuge können nach *Hoppe-Seylers*[1]) Vorschriften nachgewiesen werden: Kohlensaure und phosphorsaure Alkalien, Schwefelsäure, Salzsäure, Phosphorsäure, Kalk, Kali, Natron, Kieselsäure.

In dem salzsauren Auszuge wird geprüft auf Kalk, Magnesia, Phosphorsäure und Eisen.[2])

Die direkt aus den Fäzes extrahierte salzsaure Lösung wird ebenfalls verdampft und verascht, die Asche mit Salzsäure aufgenommen und auf Phosphor und Eisen untersucht.[3])

Veraschung auf nassem Wege.

Die von *A. Neumann*[4]) angegebene Veraschung auf nassem Wege ist sehr zweckmäßig deshalb, weil das zu veraschende Material nicht getrocknet werden muß, weil die Veraschung sehr bequem vor sich geht und Verluste durch Erhitzen und Fortfließen ausgeschlossen sind. Mit derselben kann man nur die Metalle und die nicht flüchtigen Säuren bestimmen. Salzsäure und Kohlensäure entweichen. Das Prinzip der feuchten Veraschung ist Oxydation der Substanz mittelst eines Gemisches von Salpeter- und Schwefelsäure und Vermeidung der Verkohlung durch langsames beständiges Hinzufügen des Säuregemisches.

Die feuchte Veraschung mit dem Säuregemisch wird in einem gut funktionierenden Abzug ausgeführt. Die Fäzes können feucht oder getrocknet verwendet werden. Eine Portion derselben wird in einem Rundkolben mit 5—10 cm^3 Säuregemisch (gleiche Volumenteile konzentrierter Schwefel- und Salpetersäure) übergossen und mit mäßiger Flamme erwärmt. Es steigen dann braune Dämpfe auf. Wenn die Entwicklung dieser Dämpfe

[1]) *F. Hoppe-Seyler* und *H. Thierfelder*, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 7. Aufl. Berlin 1903. § 431. S. 394—395.

[2]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, l. c. § 432. S. 396—397.

[3]) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, l. c. § 687. S. 553; § 432. S. 396—397.

[4]) Zit. nach *Hoppe-Seyler-Thierfelder*, l. c. § 428—430. S. 393—394.

geringer wird, gibt man aus einem Hahntrichter tropfenweise weiteres Gemisch zu und fährt damit fort, bis ein Nachlassen der Reaktion eintritt und die Intensität der braunen Dämpfe abgeschwächt erscheint. Um zu entscheiden, ob die Substanzzerstörung beendet ist, unterbricht man das Hinzufließen des Gemisches für kurze Zeit, erhitzt aber weiter, bis die braunen Dämpfe verschwunden sind, und beobachtet, ob sich die Flüssigkeit im Kolben dunkler färbt oder noch schwärzt. Ist das der Fall, so läßt man wieder Säuregemisch zufließen und wiederholt nach einigen Minuten obige Probe. Färbt sich die hellgelbe oder farblose Flüssigkeit bei weiterem Erhitzen nicht mehr, dann ist die Veraschung beendet. Die Flüssigkeit wird beim Erkalten völlig wasserhell. Man fügt nun etwa 3mal so viel Wasser hinzu als Säuregemisch verbraucht wurde, erhitzt und kocht etwa 5—10 Minuten, wobei braune Dämpfe, welche von der Zersetzung der entstandenen Nitrosylschwefelsäure herrühren, entweichen. Die so erhaltene Lösung der Aschebestandteile kann zur qualitativen und quantitativen Untersuchung auf alle Basen, mit Ausnahme von Ammoniak, und auf nichtflüchtige Säuren benutzt werden. Es lassen sich vor allen Dingen darin nachweisen und quantitativ bestimmen Kalium, Natrium, Kalzium und Magnesium. Bezüglich Einzelheiten in der Darstellung und Bestimmung der einzelnen Elemente ist bei *Hoppe-Seyler* [1]) nachzulesen.

Kalorimetrische Fäzesuntersuchung.

Die kalorimetrische Fäzesuntersuchung ist dann anzuwenden, wenn es darauf ankommt, Vergleiche anzustellen zwischen der Energiemenge der eingeführten Nahrung und der Energiemenge, die den Organismus im Kote verläßt, vorausgesetzt, daß dabei nicht Wert gelegt wird auf die Einzelbestimmung von N, Fett, Kohlehydraten, Zellulose usw. Derartige Bestimmungen sind an Säuglingsfäzes von *Schlossmann* [2]), an den Fäzes Erwachsener von *Lohrisch* [3]) ausgeführt worden.

Die Bestimmungen werden am besten mit Hilfe des *Hempel*schen [4]) Kalorimeters ausgeführt, welches nach folgendem Prinzip arbeitet: Die zu untersuchende Substanz wird unter einem Überdruck und Überschuß von Sauerstoff im luftleeren Raum verbrannt. Es wird dadurch erreicht, daß alle Elemente so hoch wie möglich oxydiert werden, so daß die gesamte latente Energie des betreffenden Stoffes in Wärme überführt wird. Damit die entwickelte Wärme sich nicht im Raume verliert, wird sie gezwungen, sich in einem bestimmten Medium, nämlich in Wasser, auszubreiten. Die Erwärmung des Wassers wird direkt thermometrisch gemessen und daraus die der Wärmeentwicklung entsprechende Kalorienmenge berechnet.

Das *Hempel*sche Kalorimeter enthält folgende Teile (Abbildungen der verschiedenen Teile siehe bei *Hempel* [5]).

[1]) *F. Hoppe-Seyler* und *H. Thierfelder*, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. 7. Aufl. Berlin 1903. § 433—451. S. 397—410.

[2]) *A. Schlossmann*, Über die Bedeutung kalorimetrischer Untersuchungen für klinische Zwecke. Berliner klin. Wochenschr. Nr. 12. S. 264—265. 1903.

[3]) *H. Lohrisch*, Kalorimetrische Fäzesuntersuchungen. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. **41**. H. 4. S. 308—320. 1904.

[4]) *W. Hempel*, Gasanalytische Methoden. S. 375—396. 3. Aufl. Braunschweig 1900.

[5]) *W. Hempel*, l. c. S. 379—389.

1. Einen Preßapparat, in dem die zu untersuchenden fein pulverisierten Fäzes zu Blöckchen gepreßt werden.

2. Eine Autoklave aus Flußeisen von ca. 250 *cm*³ Inhalt. Der Verschluß der Autoklave wird durch ein aufschraubbares Kopfstück gebildet. Dieses trägt ein Schraubenventil, einen Flanschenrohransatz und zwei Elektroden. Am unteren Ende des Kopfstückes sind zwei Eisenstäbe angebracht, welche an ihren Enden je eine Platinöse tragen und in die Autoklave hineinragen.

3. Eine Sauerstoffbombe mit Manometer, welche an den Flanschenrohransatz anzuschrauben ist.

4. Das eigentliche Kalorimeter. Dieses besteht aus einem Metallgefäß, welches das Kalorimeterwasser enthält und in einem Abstande von ca. 2 *cm* in einem Holzgefäße aufgehängt ist. In das Metallgefäß wird die Autoklave eingesetzt, ferner ein feines Thermometer und eine Rührvorrichtung. Das Ganze wird durch einen Deckel abgeschlossen, welcher Öffnungen für das Thermometer, das Rührwerk und die Elektroden hat.

Eine Brennwertbestimmung mit diesem Kalorimeter gestaltet sich nun folgendermaßen:

Ca. 1 *g* des lufttrockenen Fäzespulvers wird mit Hilfe des Preßapparates zu einem Blöckchen gepreßt. Gleichzeitig wird ein 11 *cm* langer Zwirnsfaden, dessen Brennwert bekannt ist, mit in die Substanz hineingedrückt. Das Blöckchen wird gewogen. Nun wird es an einem 0·1 *mm* dicken Platindraht, der zwischen den im Kopfstücke der Autoklave befindlichen beiden Platinösen ausgespannt wird, mit dem einen Ende des Zwirnsfadens aufgehängt, so daß der Block jetzt in einem kleinen Platintiegel schwebt, der in ein an den beiden Platinösen aufgehängtes Tonschälchen eingesetzt ist. Durch den Tiegel werden etwa abbröckelnde Teilchen des Blockes aufgesammelt und so der Verbrennung zugänglich gemacht. Die Autoklave wird hierauf fest verschlossen, der Sauerstoffbehälter an den Flanschenrohransatz angeschraubt, durch einströmenden Sauerstoff die in der Autoklave vorhandene Luft verdrängt und dann die Autoklave bei einem Druck von 20—21 Atmosphären unter Kontrolle des Manometers mit Sauerstoff gefüllt und durch das Schraubenventil abgeschlossen. Dann wird die Autoklave in das Metallgefäß des Kalorimeters eingesetzt, welches genau 1 *l* destillierten Wassers enthält. Die Temperatur dieses Wassers muß um ca. 1·5° C kälter als die umgebende Luft sein. Man erreicht dies durch vorherige Mischung des Wassers. Nachdem man noch das Rührwerk in das Metallgefäß gebracht hat, wird der Apparat durch den Deckel, welcher das Thermometer und die zwei Elektroden trägt, geschlossen. Die Elektroden werden mit einem kleinen zweizelligen Akkumulator verbunden. Nun beginnt die eigentliche Verbrennung. Mittelst der Rührvorrichtung wird so lange gerührt, bis das Wasser eine konstante Temperatur angenommen hat. Darauf wird gezündet und unter beständigem Umrühren mit einer Lupe an einem in $^1/_{50}$° C eingeteilten Thermometer die Erwärmung des Wassers abgelesen. Mit dem Thermometer, dessen Fehler genau bekannt sind, kann man auf $^1/_{250}$ Grad genau ablesen. Ist z. B. der Kalorienfaktor (der Kalorienfaktor des Kalorimeters ist diejenige Wärmemenge, welche nötig ist, um den im Kalorimeter vorhandenen einen Liter Wasser

um 1° C zu erwärmen; er muß für jeden Apparat besonders bestimmt werden) des betreffenden Kalorimeters 1·3583, die Menge des verbrannten Kotes 1·1058 *g* und betrug die Erwärmung des Wassers 3·925°, so ist der Brennwert für 1 *g* des betreffenden Kotes $\frac{1·3583 \times 3·925}{1·1058}$ Kalorien. Davon ist der Brennwert des Zwirnsfadens in Abzug zu bringen. Jede Brennwertbestimmung muß doppelt ausgeführt werden.

Ich fand die direkt kalorimetrisch bestimmten Brennwerte der Fäzes immer etwas höher als die aus den Analysen berechneten, was wohl an kleinen Ungenauigkeiten, die bei den Analysen unvermeidlich sind, liegt. So werden beispielsweise bei der Analyse Lezithin und Cholestearin durch Äther mit extrahiert und als Fett berechnet, während ihre eigentlichen Brennwerte höher sind. Die Methoden der Kohlehydratbestimmung leiden an den früher geschilderten Ungenauigkeiten. Meist wird bei den üblichen Analysen auch die Zellulose vernachlässigt, ebenso die Gallenfarbstoffe, Gallensäuren und sonstige organische Säuren, die im Kote vorkommen und die bei den Brennwertsbestimmungen mitbestimmt werden.

Getrennte Bestimmung von Sekreten und Nahrungsresten in normalen Fäzes nach Ury.[1, 2])

Es kann als sicher angenommen werden, daß der normale Darm des Erwachsenen mit großer Exaktheit diejenigen Nahrungssubstanzen, die durch den Verdauungsprozeß in Lösung gebracht worden sind, auch völlig resorbiert, so daß normale Darmentleerungen keine wasserlöslichen kristalloiden Substanzen (Zucker) und wasserlösliche Eiweißkörper (Albumosen, Albumine) enthalten. Von dieser Tatsache ausgehend gelangt *Ury* zu einer annähernden Feststellung des vom Darm selbst gelieferten Kotanteiles, indem er die normalen Fäzes mit destilliertem Wasser gründlichst verreibt und filtriert. Man kann dann annehmen, daß unter normalen Verhältnissen nur die von der Darmwand selbst gelieferten Sekrete in das wässerige Extrakt übergehen, während die Nahrungsreste auf dem Filter zurückbleiben. Naturgemäß ist diese Trennung der Sekrete von den Nahrungsresten keine exakte; es kann sich dabei immer nur um eine annähernde Bestimmung handeln. Wenn auch als sicher anzunehmen ist, daß erhebliche wasserlösliche Reste per os eingeführter Nahrungsmittel nicht in das wässerige Extrakt übergehen, so kann andrerseits die Frage nicht unbedingt bejaht werden, ob in der Tat das gesamte Sekret in das wässerige Extrakt übergeht. Dies tun z. B. nicht wasserunlösliche Stoffe (Fette), die im Dickdarm ausgeschieden werden, ebenso nicht abgestoßene Darmepithelien, ebensowenig in den Darmkanal ausgeschiedenes, aber mit den Fettsäuren zu fettsaurem Kalk umgesetztes Kalziumphosphat. Unter Berücksichtigung dieser Fehlerquellen ist aber die Methode annähernd richtig.

Es wird so verfahren, daß die feuchte Tageskotmenge oder der von einer größeren Zeitperiode gesammelte feuchte Stuhl frisch gewogen wird. Der größere genau abgewogene Teil des frischen Kotes wird mit destilliertem Wasser aufs feinste verrieben, auf ein Volumen von ca. 1000 bis 1500 *cm*³ gebracht und durch mehrere Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wird auf ein bestimmtes Volumen mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Darin konnte *Ury* nachweisen: HCl, geringe Mengen H_2SO_4, P-Säure (50 *cm*³

¹) *H. Ury*, Zur Methodik der Fäkaluntersuchungen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 41. S. 718—723. 1901.

²) *H. Ury*, Zur Lehre von den Abführmitteln. I. Archiv für Verdauungskrankheiten. Bd. 14. S. 411—423. 1908.

Filtrat mit Essigsäure versetzen; filtrieren; mit Uranlösung reichlicher Niederschlag). Kalk, Magnesia, Kalium, Natrium, Ammoniak, geringe Mengen Eisen. Vom Gesamtstickstoff gingen ins Filtrat über ca. 24%, von der Trockensubstanz ca. 21%, vom Ca ca. 7%.

Der kleinere zurückgebliebene Teil des frischen Kotes wird getrocknet, die Trockensubstanz bestimmt und in der üblichen Weise analysiert.

Der Gang der Fäzesuntersuchung zum Zwecke der Funktionsprüfung des Darmes nach Ad. Schmidt.[1])

Unbedingtes Erfordernis für diese Fäzesuntersuchung ist die Verabreichung der *Ad. Schmidt*schen Probediät. Dieselbe besteht aus folgendem:

Morgens: ½ *l* Milch oder Tee oder Kakao, wenn möglich mit viel Milch. Dazu 1 Semmel mit Butter und 1 weiches Ei.

Frühstück: 1 Teller Haferschleimsuppe, mit Milch gekocht, durchgeseiht (Salz- oder Zuckerzusatz erlaubt), eventuell kann auch Mehlsuppe oder Porridge gereicht werden.

Mittags: ¼ Pfund gut gehacktes mageres Rindfleisch, mit Butter leicht übergebraten (inwendig roh), dazu eine nicht zu kleine Portion Kartoffelbrei (durchgesiebt).

Nachmittags: wie morgens, aber kein Ei.

Abends: ½ *l* Milch oder 1 Teller Suppe (wie zum Frühstück). Dazu eine Semmel mit Butter und 1—2 weiche Eier (oder Rührei). Eventuell ist hierzu noch etwas Wein, dünner Kaffee zur Milch, Bouillon und etwas gewiegter kalter Kalbsbraten zu gestatten.

Für exakte klinische Untersuchungen und quantitative Analysen eignet sich die folgende detaillierte Probediät von *Ad. Schmidt*:

Morgens: 0·5 *l* Milch (oder, wenn Milch schlecht vertragen wird, 0·5 *l* Kakao, aus 20 *g* Kakaopulver, 10 *g* Zucker, 400 *g* Wasser und 100 *g* Milch bereitet), dazu 50 *g* Zwieback.

Vormittags: 0·5 *l* Haferschleim [aus 40 *g* Hafergrütze, 10 *g* Butter, 200 *g* Milch, 300 *g* Wasser, 1 Ei und etwas Salz bereitet (durchgeseiht)].

Mittags: 125 *g* gehacktes Rindfleisch (Rohgewicht), mit 20 *g* Butter leicht übergebraten, so daß es inwendig noch roh bleibt, dazu 250 *g* Kartoffelbrei (aus 190 *g* gemahlenen Kartoffeln, 100 *g* Milch, 10 *g* Butter und etwas Salz bereitet).

Nachmittags: wie morgens.

Abends: wie vormittags.

Da diese Diät sich für Ausnutzungsversuche usw. sehr gut eignet, so seien noch folgende Einzelheiten hierzu mitgeteilt:

Die Kost enthält 1·5 *l* Milch, 2 Eier, 100 *g* Zwieback, 80 *g* Hafergrütze, 50 *g* Butter, 125 *g* Rindfleisch, 190 *g* Kartoffeln. Daraus ergibt sich, nach *Schwenkenbecher*[2]) berechnet, folgende Zusammensetzung:

---

[1]) *Ad. Schmidt*, Die Funktionsprüfung des Darmes mittelst der Probekost. 2. Aufl. S. 1—37. 1908.

[2]) *A. Schwenkenbecher*, Die Nährwertberechnung tischfertiger Speisen. I.-D. Marburg 1900.

	Eiweiß	Fett	Kohlehydrate
1·5 *l* Milch	45·0	53·2	67·6
2 Eier	11·3	10·9	0·5
100 *g* Zwieback	8·55	0·98	75·1
80 *g* Hafergrütze	1·76	1·2	8·2
50 *g* Butter	0·37	42·2	—
125 *g* Rindfleisch	26·1	1·96	—
190 *g* Kartoffeln	3·95	0·28	39·9
	95·03	110·72	191·3

Hieraus resultiert bei Berechnung des Eiweißes mit 5·7 Kal., des Fettes mit 9·3 Kal., der Kohlehydrate mit 4·1 Kal. ein Gehalt der Probediät an 2355·5 Rohkalorien. Die direkte Verbrennung der Probediät im Kalorimeter bestimmte ich[1]) zu 2366·3 Kal. also eine recht gute Übereinstimmung. Das Trockengewicht einer eintägigen Probediät, die auf dem Wasserbad scharf eingetrocknet wurde, fand ich in mehreren Versuchen zu 430 *g*. Der Zellulosegehalt der eintägigen Probediät beträgt, nach *Simon-Lohrisch* bestimmt, 0·8916 *g*.[2])

Die erstgenannte Probekost wird gewöhnlich 3 Tage lang, eventuell auch noch länger gegeben, auf jeden Fall so lange, bis ein Stuhl, welcher sicher nur von dieser Diät stammt, zur Verfügung steht. Eventuell wird mit 0·3 *g* Karmin abgegrenzt. Die Fäzes sollen möglichst frisch untersucht werden. Die Untersuchung zerfällt in folgende Abschnitte:

I. Makroskopische Untersuchung. Prüfung des frisch entleerten Stuhles auf Farbe, Konsistenz, Geruch, grobe Beimengungen von Schleim, Blut und Eiter, Würmern, Steinen. Sodann sorgfältigste Verreibung eines zirka walnußgroßen Teiles des gut vermischten Stuhlganges in der Porzellanreibeschale wie früher geschildert und Besichtigung des verriebenen Stuhles auf dem schwarzen Makroskopierteller (S. 338). Daselbst Prüfung auf Zellulosereste, Bindegewebe, Sehnenstückchen, Muskelreste, Kartoffelreste, Fettreste, Schleim, Eiter.

Eventuell mikroskopische Besichtigung der makroskopisch gefundenen Teilchen.

II. Mikroskopische Untersuchung. 3 Präparate:

1. Besichtigung eines kleinen, in dünner Schicht unter dem Deckglase ausgebreiteten Partikelchens des unverriebenen Kotes (Muskelbruchstücke, gelbe Kalksalze, ungefärbte Seifen, Fettsäure- und Fettseifennadeln, Neutralfett, Kartoffelzellen, Zellulosereste, Kakaoreste, Schleim, Eiter, Parasiteneier).

2. Das früher (S. 364—365) beschriebene erhitzte Essigsäurepräparat, in dem die flüssigen oder erstarrten Fettsäureschollen eine annähernde Abschätzung des Fettgehaltes des Stuhlganges ermöglichen.

3. Ein mit starker *Lugol*scher Lösung innig vermischtes Fäzespartikelchen (S. 369) in dünner Schicht (freie Stärkekörner, in Zellu-

[1]) *H. Lohrisch*, Kalorimetrische Fäzesuntersuchungen. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. 41. H. 4. S. 315. 1904.

[2]) *H. Lohrisch*, Über die Bedeutung der Zellulose im Haushalte des Menschen. Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. 47. H. 2 und 3. S. 239. 1906.

losehüllen eingeschlossene Stärke, blaugefärbte Jodpilze, gelbgefärbte Hefezellen, Milchsäurebazillen und Sarcine).

III. Chemische Untersuchung: Prüfung der Reaktion (S. 337). Sublimatprobe (S. 390 und 393). Brutschrankprobe (S. 348 und 370—372). Untersuchung auf gelöstes Eiweiß (S. 344—346).

Gewinnung und Analyse der Darmgase.

Bei den Darmgasen können wir unterscheiden zwischen den direkt im Darm gebildeten und als solche entleerten Gasen (Dickdarmgase) und denen, die bei der Nachgärung des Kotes im Brutschrank (Brutschrankprobe von *Ad. Schmidt* vgl. S. 348 und 370—372) entstehen (Nachgärungsgase).

Die Dickdarm- und Nachgärungsgase sind Gemische von CO_2 (entsteht besonders aus den Kohlehydraten und der Zellulose, in geringem Grade aus Eiweiß), H_2 (entsteht aus Zellulose, Kohlehydraten und Eiweiß), CH_4 (entsteht bei der Vergärung der Zellulose und der Kohlehydrate und bei der Zersetzung des Eiweißes), N_2 und O_2. N_2- und O_2-Beimengungen zu den Gasen sind stets künstliche. Sie stammen zum Teile von verschluckter Luft her. Der N_2 kann auch aus dem Blut ins Darmlumen diffundieren.

Ammoniak, H_2S und Methylmerkaptan sind nur in ganz geringen Mengen in den Darmgasen enthalten. Ammoniak entsteht bei der Eiweißfäulnis. H_2S kommt nicht regelmäßig vor, sondern meist nur bei Genuß bestimmter schwefelhaltiger Nahrungsmittel (Zwiebel, Knoblauch, Rettich). Sie können im allgemeinen vernachlässigt werden.

Es werden untersucht entweder die dem Darm direkt entnommenen Dickdarmgase oder die Nachgärungsgase. Wenn es darauf ankommt, sich über die Zusammensetzung der im Darme selbst entstehenden Gase zu orientieren, so ist natürlich die direkte Untersuchung der Dickdarmgase der sicherste Weg. Es ist nach *Ad. Schmidts*[1]) Untersuchungen aber auch angängig, aus der Zusammensetzung der bei der Nachgärung des Kotes entwickelten Gase Rückschlüsse auf die Dickdarmgase selbst zu ziehen. Es hat sich gezeigt, daß die Nachgärungsgase ihrer Zusammensetzung nach ohne weiteres mit den Dickdarmgasen identifiziert werden können. Auch quantitativ geht die Nachgärung mit der Darmgärung parallel. Man kann sich deshalb, wenn es aus äußeren Gründen nicht möglich ist, Dickdarmgase direkt zu gewinnen, mit der Untersuchung der Nachgärungsgase begnügen.

Eine quantitative Bestimmung der Dickdarmgase (etwa von 24 Stunden) ist nicht möglich, da das Aufsammeln derselben außerordentlich schwierig ist. Man kann die Menge der Dickdarmgase nur relativ beurteilen aus ihrem N_2- und CH_4-Gehalte. Beim vergleichenden Studium der Dickdarm- und Nachgärungsgase ergab sich nämlich, daß die Gasbildung innerhalb des Darmes um so geringer ist, je höher der prozentige Gehalt der Flatus an N_2 und CH_4 ist; auch die Menge der Nachgärungsgase ist um so geringer, je mehr sie N_2 und CH_4 enthalten.[2])

Die Gewinnung der Gase.

Nachgärungsgase. *Ad. Schmidt*[3]) verfährt so, daß er, um genauere Analysen und größere Gasmengen zu erhalten, die ganze Tages-

[1]) *Ad. Schmidt*, Experimentelle und klinische Untersuchungen über Funktionsprüfung des Darmes. II. Mitteilung. Über die Beziehungen der Fäzesgärung zur Darmgärung und zu den Flatus. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **61**. H. 5 u. 6. S. 545—570. 1898.

[2]) *Ad. Schmidt*, Experimentelle und klinische Untersuchungen über Funktionsprüfung des Darmes. II. Mitteilung. Über die Beziehungen der Fäzesgärung zur Darmgärung und zu den Flatus. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **61**. H. 5 u. 6. S. 560. 1898.

[3]) *Ad. Schmidt*, Experimentelle und klinische Untersuchungen über Funktionsprüfung des Darmes. I. Mitteilung. Über Fäzesgärungen. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. **61**. H. 3 und 4. S. 287—288.

portion des frischen Kotes mit sterilisiertem Wasser verrührt, in einem Glase mit durchbohrtem Kautschukstöpsel luftfrei verschließt und in den Brutschrank stellt. Durch den Kautschukstöpsel leitet ein Glasrohr mit anschließendem Röhrensystem die gebildeten Gase durch den Deckel des Brutschrankes hindurch in ein mit konzentrierter Kochsalzlösung gefülltes Gasometer. Das ganze Röhrensystem wird vorher möglichst vollständig mit Wasser gefüllt. Es ist nicht immer möglich, es gänzlich von Luftblasen zu befreien, doch bedingt dies keinen größeren Fehler, weil der Kot so wie so während der Zeit der Entleerung bis zur Verarbeitung, besonders während des Verrührens, mit der Luft in Berührung kommt und daher stets ein gewisses Quantum Luft einschließt. Auch läßt sich der Fehler durch Berechnung des Luftquantums aus dem O_2-Gehalte des entwickelten Gases berechnen. Ein gewisser Fehler wird dadurch bedingt, daß in den Fäzes bei der Entleerung Gase, die schon im Darm gebildet wurden, eingeschlossen sind, die also streng genommen nicht zu den Nachgärungsgasen, sondern zu den Dickdarmgasen gerechnet werden müssen. Aus dieser Fehlerquelle ist wahrscheinlich ein etwaiger N_2-Gehalt der Nachgärungsgase (der nach Abzug der Luft restiert) zu erklären. Zum Auffangen der Gase wird, wie erwähnt, ein kleines Gasometer benutzt, welches ähnlich wie ein Spirometer gebaut ist. Die Gase treten von unten her in die Gasometerglocke ein und werden durch ein am oberen Ende der Glocke angebrachtes Rohr mittelst der weiter unten beschriebenen Entnahmeapparate entnommen. Für kleinere Kotmengen kann man auch das *Strasburger*sche Gärungsröhrchen (Fig. 100, S. 370) benutzen. Ganz geeignet scheint mir auch zur Entnahme von Gasen aus dem Gärungsröhrchen die früher (Fig. 101, S. 371) beschriebene *Münzer*sche Modifikation des *Strasburger*schen Gärungsröhrchens zu sein, bei welchem das Gas aus dem seitlich angeschmolzenen Glasrohr direkt entnommen werden kann, zumal wenn man das *Münzer*sche Röhrchen für größere Mengen Kot und Gas entsprechend größer konstruieren würde.

Dickdarmgase. Zur Aufsammlung der Dickdarmgase hat *Ad. Schmidt*[1]) folgendes Verfahren angegeben: Ein Gasometer, dessen Glocke völlig mit konzentrierter NaCl-Lösung gefüllt ist, hat am oberen Ende dieser Glocke einen Fortsatz in Gestalt eines Glasrohres. Dieses Glasrohr ist durch einen Gummischlauch mit dem in den Anus einzuführenden Ansatzstück verbunden. Dieses stellt eine langgestielte Hartgummibirne mit zahlreichen feinen seitlichen Öffnungen dar. Der Gasometer und Ansatzstück verbindende Schlauch ist unmittelbar über der Gasometerglocke und unmittelbar vor dem Ansatzstück mit Klemmen zu verschließen. Das ganze Röhrensystem ist mit Ausnahme des Ansatzstückes ebenfalls mit konzentrierter Kochsalzlösung gefüllt. Das Ansatzstück liegt beständig in einer Schale mit destilliertem Wasser und wird, wenn die Versuchsperson den

[1]) *Ad. Schmidt*, Experimentelle und klinische Untersuchungen über Funktionsprüfung des Darmes. II. Mitteilung. Über die Beziehungen der Fäzesgärung zur Darmgärung und zu den Flatus. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. 61. H. 5 und 6. S. 548—550. 1898.

bevorstehenden Abgang von Flatus spürt, soweit in den After eingeführt, daß die Birne oberhalb des Sphinkter zu liegen kommt. Das Gasometer wird dabei so eingestellt, daß die Flüssigkeit im äußeren Teile erheblich niedriger steht als in der Glocke. Sollen nun jetzt die Gase entnommen werden, so werden die beiden Klemmen geöffnet und es wird infolge des erwähnten Standes des Gasometers Gas angesogen. Ist dies geschehen, so werden die Klemmen wieder angelegt, die Birne wird herausgenommen, in die Schale mit Wasser getan und durch neues Öffnen der Klemmen die noch im Schlauche vorhandenen Gase nachgesogen, wobei sich das Röhrensystem aus der Schale mit Wasser füllt. Das Gasometer kann nach *Hempel* [1]) auch mit konzentrierter Lösung von Chlormagnesium gefüllt sein. Über sonstige zum Auffangen von Gasen geeignete Apparate vergleiche bei *Hempel*. [2])

Ein Eindringen von Luft ist bei diesem Verfahren nicht immer zu vermeiden. Es ist aber, wie schon erwähnt, für die Analysenresultate ohne Bedeutung. Luft und restierender N_2 werden auch hier von vornherein in Abrechnung gebracht, da N_2 im Darm selbst nicht gebildet wird.

Die Analyse der Gase.

Die Gasanalyse wird mit Hilfe der Apparate und Methodik von *Hempel* [3]) ausgeführt. Nach *Ad. Schmidts* [4]) Erfahrungen kann von vornherein auf Bestimmung von Ammoniak und H_2S verzichtet werden, da deren Mengen noch geringer als die Fehlergrenzen der Methode sind.

Alle absorbierbaren Gase werden durch absorbierende Mittel bestimmt, die nichtabsorbierbaren durch Verpuffung.

Zunächst seien ganz kurz die hierzu nötigen *Hempel*schen Apparate geschildert:

Zur Entnahme des Gases aus dem Gasometer dient die *Hempel*sche Gasbürette [5]) (Fig. 103). Sie besteht aus zwei Glasröhren, welche in eiserne Füße eingesetzt sind und durch einen ca. 120 *cm* langen dünnen Gummischlauch miteinander verbunden sind. In den Gummischlauch ist in der Mitte ein Stück Glasrohr eingeschaltet. Die eine der Röhren, die Meßröhre, läuft in ihrem oberen Ende in ein 3 *cm* langes, $^1/_2$—1 *mm* weites starkwandiges Röhrchen aus, an welches mittelst Draht ein kurzes Stück schwarzer dichter Gummischlauch befestigt ist, der mit einem Quetschhahn versehen ist. Die Meßröhre ist in 100 *cm*³ eingeteilt. Die andere Röhre, die Niveauröhre, dient, wenn beide Röhren und der Gummischlauch vollständig mit Wasser gefüllt sind, zum Füllen oder Entleeren der Meßröhre und zum Ansaugen des Gases in die Meßröhre. Um Gas aus der Gasometerglocke zu entnehmen, wird die vollständig mit Wasser gefüllte Meßröhre durch ein feines, gebogenes, mit Wasser gefülltes Glasrohr mit dem am oberen Ende der Gasometerglocke befindlichen und ebenfalls mit Gummischlauch armierten Glasrohr verbunden. Der Übertritt von Gas aus der Gasometerglocke in die Meßröhre erfolgt dann beim Senken der Niveauröhre. Auf diese Weise können das gesamte Gasquantum und auch einzelne Portionen desselben genau gemessen werden.

[1]) *W. Hempel*, Gasanalytische Methoden. 3. Aufl. S. 25. Braunschweig 1900.

[2]) *W. Hempel*, l. c. S. 22—26.

[3]) *W. Hempel*, l. c. S. 27—221.

[4]) *Ad. Schmidt*, Experimentelle und klinische Untersuchungen über Funktionsprüfung des Darmes. I. Mitteilung. Über Fäzesgärungen. Deutsches Arch. f. klin. Med. Bd. 61. H. 3 und 4. S. 317. 1898.

[5]) *W. Hempel*, l. c. S. 29—33.

Zur Absorption absorbierbarer Gase dient die *Hempel*sche Absorptionspipette[1]) für feste und flüssige Reagentien. Deren Konstruktion ist aus Fig. 104 ersichtlich. Sie besteht aus zwei großen miteinander kommunizierenden Kugeln und einem doppelt gebogenen starkwandigen Kapillarrohr. Die größere und länglich geformte Kugel wird durch den an ihrem unteren Ende befindlichen, durch Gummistopfen verschließbaren halsförmigen Ansatz mit dem absorbierenden Mittel gefüllt. Diese Kugel faßt etwa 150 cm^3; die zweite kleinere Kugel faßt etwa 100 cm^3. Das in der Meßröhre abgemessene Gasquantum wird in die Absorptionspipette überführt dadurch, daß die Meßröhre mit dem oberen Ende des Kapillarrohres der Absorptionspipette mit Hilfe des daselbst befestigten Gummischlauchstückes und eines gebogenen dünnen Glasrohres verbunden wird. Das Kapillarrohr der Absorptionspipette muß dabei mit dem Absorptionsmittel gefüllt sein. Wenn jetzt die Klemme am oberen Ende der Meßröhre geöffnet und die mit Wasser gefüllte Niveauröhre gehoben wird, so strömt das in der Meßröhre befindliche Gas in die Absorptionspipette über. Dabei wird die Absorptionsflüssigkeit in die kleinere Kugel zum Teil verdrängt. Es bleibt aber noch genügend Absorptionsmittel in der großen Kugel zurück, um auf das Gas einwirken zu können. Wenn das Gas einige Minuten in der Absorptionspipette gelassen worden ist, wird es in derselben Weise in die Meßröhre bei gesenkter Niveauröhre zurückgeleitet. Man kann dann die Menge des absorbierten Gases unmittelbar ablesen.

Fig. 103.

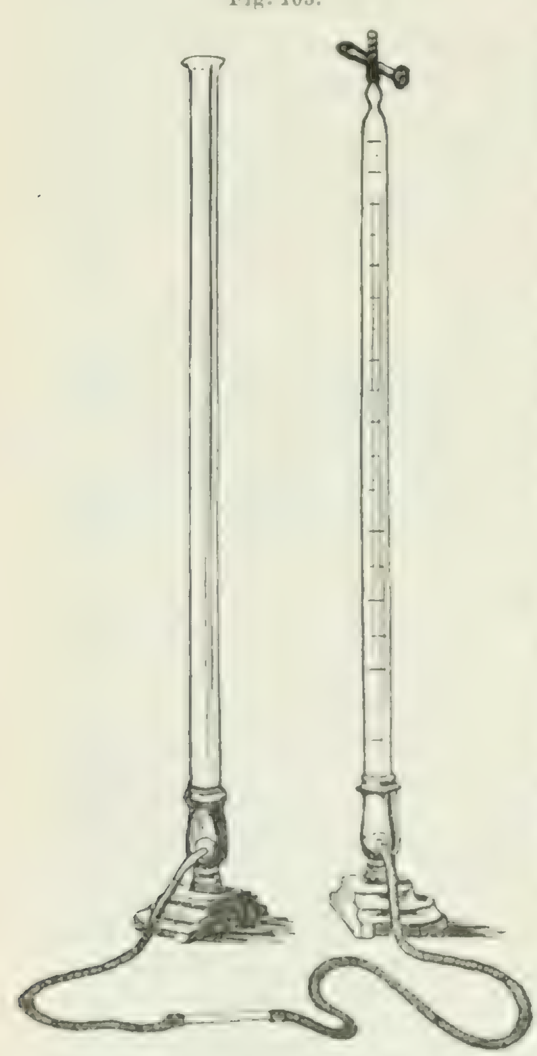
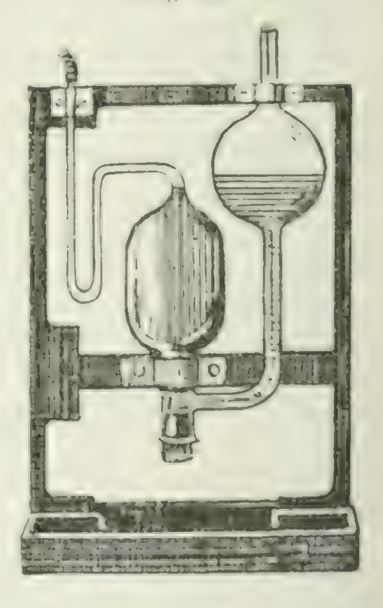


Fig. 104.

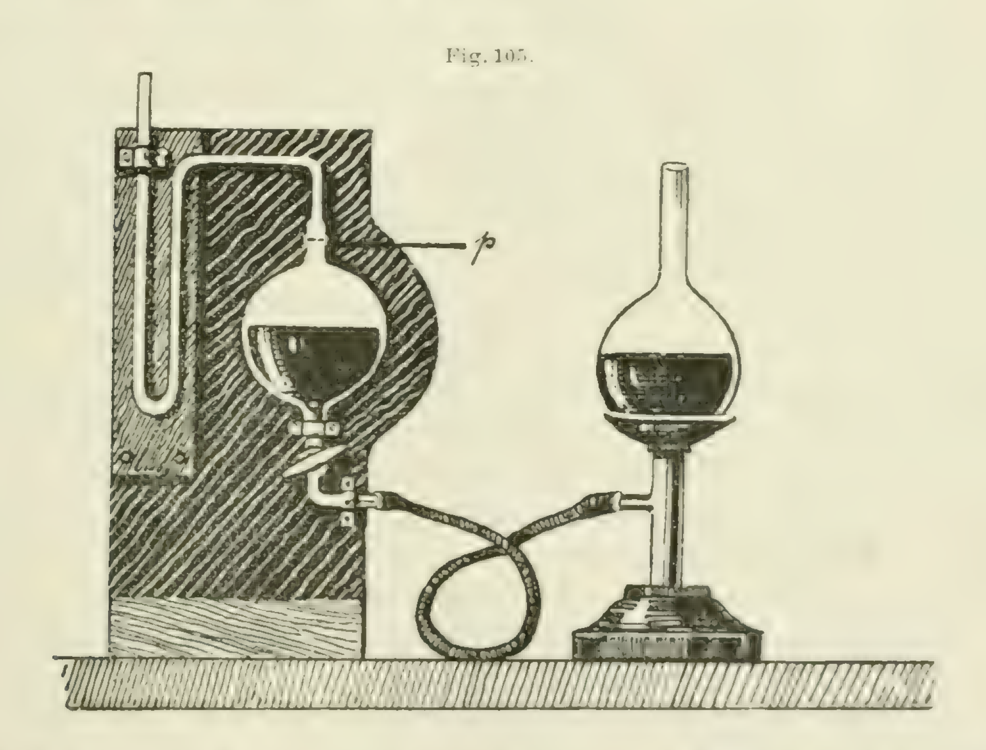


Die Explosionspipette[2]) von *Hempel* (Fig. 105) besteht aus einer dickwandigen Explosionskugel und einer Niveaukugel, welche durch einen übersponnenen Gummischlauch miteinander verbunden sind. Die Explosionskugel hat an ihrem oberen Ende zwei dünne Platindrähte *(p)* eingeschmolzen, welche mit einer Tauchbatterie in Verbindung stehen und zur Entzündung brennbarer Gase dienen. Das untere Ende der Explosionskugel ist mit einem Glashahn geschlossen. Am oberen Ende der Explosionskugel ist, wie bei der Absorptionspipette, ein dickwandiges Kapillarrohr angeschlossen, von dem aus die Füllung der Absorptionskugel durch Verbindung mit der Meßbürette unter Heben und Senken der Niveaukugel erfolgt. Die Explosionen werden immer unter Anwendung von Quecksilber als Sperrflüssigkeit angewendet. Das Quecksilber ermöglicht es nämlich, nachträglich die durch die Verbrennung gebildete Kohlensäure zu bestimmen, was bei Explosion über Wasser wegen der Absorption der Kohlensäure durch das Wasser nicht möglich ist.

[1]) *W. Hempel,* Gasanalytische Methoden. 3. Aufl. S. 38. Braunschweig 1900.
[2]) *W. Hempel,* l. c. S. 114—115.

Zur Analyse des aus CO_2, O_2, H_2, CH_4 und N_2 bestehenden Darmgasgemisches wird nun folgendermaßen verfahren: Es wird zunächst das gesamte Quantum der gesammelten Gase in der Meßröhre bestimmt. Das gesamte in der Meßröhre befindliche Gasquantum wird sodann zur Absorption der CO_2 [1]) in eine Absorptionspipette geleitet, deren große Kugel gefüllt ist mit kleinen, 1—2 *cm* langen und zirka 5 *mm* dicken Röllchen von eisernem feinmaschigen Drahtnetz und einer Auflösung von 1 Gewichtsteil käuflichem Ätzkali in 2 Gewichtsteilen Wasser. Die Drahtnetzröllchen haben den Zweck, die absorbierende Fläche nach Möglichkeit zu vergrößern. Nach 1—2 Minuten ist die CO_2 vollständig absorbiert. Hierauf wird das Gas aus der Absorptionspipette wieder in die Meßröhre zurückgeleitet und die Menge der absorbierten CO_2 notiert.

Fig. 105.



Nun folgt die Bestimmung des O_2-Gehaltes. [2]) Dazu wird die gesamte, nunmehr CO_2-freie Gasmenge aus der Meßröhre in eine zweite Absorptionspipette überführt, deren Absorptionskugel gefüllt ist mit kleinen Röllchen von Kupferdrahtnetz und einer Lösung, bestehend aus gleichen Teilen einer gesättigten Lösung des in Stücken käuflichen anderthalbfach kohlensauren Ammoniaks und einer einfach verdünnten Lösung von Ammoniak von 0·93 spezifischem Gewicht. Da das metallische Kupfer oft oberflächlich mit etwas Fett überzogen ist, so kann man dies zweckmäßigerweise durch Anätzen mit etwas Salpetersäure vor der Benutzung entfernen. Mit diesem Kupferammoniakgemisch findet eine sehr rasche und vollständige O_2-Absorption statt. Hierauf erfolgt wiederum Überleitung des Gasrestes aus der Absorptionspipette in die Meßröhre und Notierung des O_2-Gehaltes.

[1]) *W. Hempel*, Gasanalytische Methoden. 3. Aufl. S. 181—182. Braunschweig 1900.
[2]) *W. Hempel*, l. c. S. 142—144

Zur Bestimmung des H_2 in diesem Gasreste, der nunmehr ein Gemisch von H_2, CH_4 und N_2 darstellt, verfährt man nach *Hempel*[1]) in folgender Weise: *Hempel* zeigte, daß der Wasserstoff aus einem derartigen Gasgemisch durch Palladiumschwamm bei zirka 100° glatt absorbiert wird. Zu diesem Zwecke verbindet man die Meßröhre mit dem einen Schenkel einer U-förmig gebogenen Röhre von 4 *mm* lichter Weite und 20 *cm* Gesamtlänge, welche mit 4 *g* Palladiumschwamm gefüllt ist. Der andere Schenkel des U-förmigen Rohres wird mit einer gewöhnlichen Gaspipette verbunden, d. h. mit einer analog der Absorptionspipette gebauten Pipette, welche mit Wasser gefüllt ist und lediglich als Sperrvorrichtung dient. Das U-förmige Rohr steht in einem großen Becherglas mit warmem Wasser von 90—100°. Man treibt nun das Gasgemisch aus der Meßröhre durch Heben und Senken der Niveauröhre dreimal durch das Palladiumrohr hin und her. Hierauf ersetzt man das heiße Wasser durch solches von Zimmertemperatur und führt den Gasrest noch zweimal hin und her, um denselben vollständig abzukühlen. Es gelingt so mit Sicherheit, den Wasserstoff bis auf die letzte Spur zu absorbieren. Das Gas wird dann wieder in die Meßröhre überführt. Die nach der Absorption eingetretene Differenz entspricht dem Wasserstoffgehalt + der Menge Sauerstoff, welche in der in dem U-förmigen Rohre eingeschlossenen Luft enthalten war. Diese Luftmenge läßt sich aber ein für allemal als Konstante ermitteln.

Der jetzt noch bleibende Gasrest enthält CH_4 und N_2. Hierin wird CH_4 durch Verpuffung in der Explosionspipette bestimmt. Dazu werden etwa 15 cm^3 des Gasrestes in der Meßröhre abgemessen. Zu diesen 15 cm^3 wird durch Senken des Niveaurohres zunächst eine beliebige Quantität Luft zugeführt und das Gesamtquantum abgelesen. Das so entstandene Gemisch wird in die Explosionspipette gebracht und dann noch so viel Luft in der Meßröhre abgemessen, als voraussichtlich zur vollständigen Verbrennung des Gasrestes notwendig ist, und diese ebenfalls in die Explosionspipette überführt. Ein Volumen CH_4 braucht zwei Volumen O_2 und bildet ein Volumen CO_2 bei der Verbrennung.[2]) Das Gasluftgemisch wird in der Pipette durch tüchtiges Schütteln gemischt und explodiert. Nach der Explosion wird der Gasrest zur Absorption der gebildeten CO_2 in die Ätzkalipipette überführt. Dann wird in der Meßröhre gemessen. Bekannt ist das Gesamtvolumen des in die Explosionspipette überführten Gemisches von Gasrest und Luft. Von diesem wird das Gesamtvolumen, welches nach der Explosion abgelesen wird, abgezogen. Der dritte Teil des verschwundenen Volumens entspricht der CH_4-Menge. Bei der Prozentberechnung des CH_4 muß noch das Volumen des Palladiumrohres mit berechnet werden.

Der nunmehr noch vorhandene Gasrest ist N_2.

[1]) *W. Hempel*, Gasanalytische Methoden. 3. Aufl. S. 162—174. Braunschweig 1900.
[2]) *W. Hempel*, l. c. S. 203.

Methodik der Milchuntersuchung.

Von **E. F. Edelstein**, Charlottenburg.

Die Methodik der Milchuntersuchung.

Diese Methodik soll in knapper Darstellung Angaben enthalten, wie man die Milch vom wissenschaftlichen Standpunkte aus untersucht. Die Untersuchung der Milch vom Standpunkte des Milchpraktikers, der Milchhygiene und der polizeilichen Milchkontrolle kann hier nur ganz kurz, soweit sie in den Rahmen der verschiedenen Methoden hineinpaßt, behandelt werden.

Die Milch als Sammelbegriff, gleich ob sie Menschen- oder Tiermilch ist, stellt eine bläulich- oder gelblich-weiße, undurchsichtige Flüssigkeit dar. Im Speziellen hat die Kuhmilch folgende Eigenschaften: Sie ist gegen Lackmus amphoter; ihr spezifisches Gewicht hält sich in den Grenzen zwischen 1·028—1·03. Der Gefrierpunkt beträgt im Mittel —0·555°. Der Siedepunkt ist etwas höher als beim Wasser (+0·2°).

Beim Kochen nimmt die Milch einen gelblichen Farbenton an. Läßt man sie bei gewöhnlicher Temperatur stehen, so sammelt sich das spezifisch leichtere Fett in Form von Fettkügelchen an. Erhitzt man frische Milch zum Sieden, so bleibt sie unverändert. Beim längeren Erhitzen bildet sich an der Oberfläche ein Häutchen, welches wesentlich aus eingedampfter Milch besteht. Beim längeren Stehen gerinnt die Milch freiwillig unter dem Einfluß der bakteriellen Zersetzung des Milchzuckers zu Milchsäure, welche das Kasein ausfällt.

Versetzt man Milch mit Lab, so scheidet sich in dicker Masse der Käsestoff und eine gelbliche Flüssigkeit aus: die süße Molke.

Die Undurchsichtigkeit der Milch wird durch das in derselben in gequollenem Zustande suspendierte Kasein hervorgerufen. Setzt man zur Milch Alkali oder am besten Ammoniak zu, so löst sich darin das Kasein und es entsteht eine fast klare Flüssigkeit.

Die gelbliche Färbung rührt von dem im Milchfett enthaltenen Farbstoff her. Je fettärmer eine Milch ist, desto weißer ist ihr Aussehen.

Die Wärmekapazität der Kuhmilch ist geringer als die des Wassers, d. h. man braucht zur Temperaturerhöhung von 1° für Milch weniger Kalorien als für dieselbe Menge Wasser. Die Wärmekapazität beträgt nach

Fleischmann[1]) 0·847; nach neueren Untersuchungen[2]) desselben Forschers 0·935 (Vollmilch).

Läßt man die Milch gefrieren, so entmischt sie sich unter Erstarren des größten Teils; nur ein ganz kleiner Teil bleibt flüssig. Dabei ändert sich anscheinend der physikalische Zustand des Kaseins. *Fuld* und *Wohlgemuth*[3]) haben gezeigt, daß die Frauenmilch durch Gefrieren soweit geändert wird, daß beim nachträglichen Auftauen das Kasein direkt mit Säuren fällbar ist. Sie führen diesen Umstand auf die physikalische Änderung des Lösungszustandes zurück, in welchem sich das Kasein befindet.

Die Viskosität der warmen Milch ist geringer als die der kalten.

Die Milch setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen: Wasser, Eiweiß, Milchzucker, Fett, Salzen und einigen organischen Stoffen wie Harnstoff, Purinbasen (Xanthin, Hypoxanthin) und Kreatin und Kreatinin. Ferner Zitronensäure, in geringen Spuren Milchsäure, Orotsäure, Sulfocyannatrium, Lezithin und Cholesterin. Außerdem enthält die Milch noch Fermente und Gase, und zwar: Kohlensäure, Stickstoff und Sauerstoff.

Die durchschnittliche Zusammensetzung der Kuhmilch ist folgende (*Raudnitz*[4]):

Wasser	88%
Trockensubstanz	12%
Fett	4·8%
Kasein	3%
Albumin und Globulin	0·3%
Gesamtstickstoff	0·55%
Extraktivstoff	0·05%
Eiweißstickstoff	0·5%
Kaseinstickstoff	0·45%
Milchzuckeranhydrit	4·4%
Zitronensäure	0·12—0·2%
Harnstoff	0·1%
Asche	0·7%
Gase	4·2—8·6 Vol.-%

Der Gehalt der Kuhmilch an Salzen ist folgender (*Söldner*[5]):

[1]) *Fleischmann*, Beiträge zur Physik der Milch, Betrachtungen über das sogenannte schwedische Abrahmverfahren. Sitzungsberichte der bayr. Akad. d. Wiss. Bd. **4**. 1874.

[2]) *Fleischmann*, Spezifische Wärme der Milch. Journ. f. Landw. Bd. **50**. 33. 1902.

[3]) *Fuld* und *Wohlgemuth*, Eine neue Methode zur Ausfällung des reinen Kaseins aus der Frauenmilch durch Säure und Lab, sowie über die Natur der labhemmenden Wirkung der Frauenmilch. Biochem. Zeitschr. 5. 118. 1907.

[4]) *Raudnitz*, „Die Milch", im Handbuch d. Kinderheilk. von *Pfaundler-Schlossmann*. Leipzig. C. W. Vogel. S. 133. 1910.

[5]) *Söldner*, Die Salze der Milch und ihre Beziehungen zu dem Verhältnis des Kaseins. Landwirtsch. Versuchsstationen. Bd. **35**. 351. 1889. — *Hammarsten*, Lehrbuch d. physiol. Chem. Wiesbaden. 623. 1910.

Asche	0·75—0·8%
CaO	1·98 im Liter Milch
P_2O_5	1·82 „ „ „
Cl	0·98 „ „ „
K_2O	1·72 „ „ „
Na_2O	0·51 „ „ „
MgO	0·20 „ „ „
Fe_2O_3	0·0035 im Liter Milch (nach *Bunge*[1])

Die Frauenmilch ist auch amphoter, sie ist aber nach den Untersuchungen von *Courant*[2]) etwas stärker alkalisch als die Kuhmilch. Das spezifische Gewicht der Frauenmilch ist dasselbe wie das der Kuhmilch.

Ganz abgesehen davon, daß das Kasein der Frauenmilch andere Eigenschaften aufweist als das der Kuhmilch, daß ferner das Frauenmilchfett im Gegensatz zum Kuhmilchfett nur Spuren von flüchtigen Säuren enthält, unterscheiden sich die beiden besonders im Gehalt an Albumin und Kasein und auch im Milchzuckergehalt. Die Kuhmilch enthält Albumin und Kasein im Verhältnis von 1 : 6, die Frauenmilch dagegen nur im Verhältnis von 1 : 1. Die Zusammensetzung der Frauenmilch ist im Durchschnitt nach *J. König*[3]) folgende:

Wasser	87·58%
Kasein	0·80%
Albumin	1·21%
Stickstoffsubstanz	2·01%
Fett	3·74%
Milchzucker	6·37%
Asche	0·3%

Wie man daraus ersieht, ist der Aschegehalt viel geringer als in der Kuhmilch.

Nach *Blauberg*[4]) enthalten 100 Teile Frauenmilch:

K_2O	0·0690
Na_2O	0·0049
CaO	0·0394
MgO	0·0068
Fe_2O_3	0·0020
Cl	0·0294
P_2O_5	0·0294
SO_3	0·0143

[1]) *Bunge*, Der Kali-, Natrium- und Chlorgehalt der Milch, verglichen mit dem anderer Nahrungsmittel und dem Gesamtorganismus der Säugetiere. Zeitschr. f. Biol. 10. 295 und 305. 1874.

[2]) *Courant*, Über die Reaktion der Kuh- und Frauenmilch und ihre Beziehungen zur Reaktion des Kaseins und der Phosphate. *Pflügers* Arch. f. Physiol. 50. 109. 1891.

[3]) *J. König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Berlin, J. Springer. Bd. 2. 598. 1904.

[4]) Zitiert nach *Engel*, „Die Frauenmilch", in *Sommerfelds* Handbuch der Milchkunde. S. 800. 1909.

Nach *Bahrdt* und *Edelstein*[1]) enthält die Frauenmilch in 1000 Teilen im Durchschnitt 1·93 *mg* Eisenoxyd und 0·42 *g* CaO.

Nach einer neuerdings von *Schloss*[2]) genau durchgeführten Analyse der Frauenmilch hat diese folgende Zusammensetzung (Durchschnitt aus 8 Analysen):

Im Liter Milch

Fett	37·88
N	1·847
Asche	1·839
CaO	0·3758
MgO	0·0857
K_2O	0·5291
Na_2O	0·1886
P_2O_5	0·4045
Cl	0·5232

In folgender Tabelle (nach *J. König*[3]) sei noch zum Vergleich die Zusammensetzung der Frauen-, Kuh-, Ziegen-, Schaf-, Eselinnen- und Stutenmilch in Prozenten angegeben:

	Frau	Kuh	Esel	Schaf (Milchschaf)	Ziege	Stute
Spez. Gewicht	1·0298	1·0313	—	1·0355	1·0305	1·0347
Wasser	87·58	87·27	90·12	83·57	86·88	90·58
Kasein	0·80	2·88	0·79	4·17	2·87	1·30
Albumin	1·21	0·51	1·06	0·98	0·89	0·75
Stickstoffsubstanz	2·01	3·39	1·85	5·15	3·76	2·05
Fett	3·74	3·68	1·37	6·18	4·07	1·14
Milchzucker	6·37	4·94	6·19	4·17	4·64	5·87
Asche	0·30	0·72	0·47	0·93	0·85	0·36

Die Eigenschaften der Milch anderer Tiere gleichen im großen und ganzen denen der Kuhmilch. Die Ziegenmilch hat einen gelblicheren Farbenton und ein spezifisches Aroma. Sie enthält meistens mehr Fett und mehr Albumin als die Kuhmilch. Die Schafmilch zeichnet sich durch ein höheres spezifisches Gewicht aus und ist sehr fettreich. Die Eselinnenmilch nähert sich in ihren Eigenschaften der Frauenmilch, ist aber bedeutend ärmer an Fett.

Die Entscheidung, von welcher Tierart die zur Untersuchung vorliegende Milch abstammt, ist nicht einfach und die diesbezügliche Methodik noch

[1]) *Bahrdt* und *Edelstein*, Das Kalkangebot in der Frauenmilch. Jahrb. f. Kinderheilkunde. 72. Ergänzungsheft 16. 1910 und Ein Beitrag zur Kenntnis des Eisengehalts der Frauenmilch und seiner Beziehungen zur Säuglingsanämie. Zeitschr. f. Kinderheilk. Bd. 1. 182. 1910.

[2]) *Schloss*, Die chemische Zusammensetzung der Frauenmilch auf Grund neuer Analysen. Monatschr. f. Kinderheilk. 9. 636. 1911.

[3]) *König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Bd. 2. 1904. 598. 602. 655 und *Sommerfeld*, Handbuch der Milchkunde. 233. 1909.

nicht sicher. Die *Umikoff*sche[1]) Reaktion dient zur Unterscheidung von Frauen- und Kuhmilch. Beim Erwärmen von 5 *cm*³ Milch mit 2·5 *cm*³ 10%igem NH_3 auf 60° und 15 Minuten wird reine Frauenmilch violettrot, reine Kuhmilch gelb gefärbt.

Die Zusammensetzung der Milch im allgemeinen ist großen Schwankungen unterworfen. Sie ist von sehr vielen Faktoren abhängig. Eine wichtige Rolle spielt die Individualität und die Rasse der Tiere. Die Beschaffenheit der Milch wird auch von der Melkzeit beeinflußt. Gewöhnlich ist die Mittags- und Abendmilch verschieden von der Morgenmilch.

Die Frauenmilch ist, besonders was ihren Fettgehalt anbelangt, vor und nach dem Anlegen anders zusammengesetzt (*Reyher*[2]).

Eine wesentlich andere Zusammensetzung besitzt die Milch der ersten Tage, die sogenannte Kolostralmilch. Das Kolostrum der Kuhmilch ist dickflüssig, nicht amphoter, sondern entweder alkalisch oder sauer und besitzt ein viel höheres spezifisches Gewicht. Die Menge der Trockensubstanz ist fast doppelt so groß wie bei der gewöhnlichen Milch, der Stickstoffgehalt sehr hoch. Ebenso verhält es sich mit dem Gehalt an Albumin und Globulin. Der Zuckergehalt ist sehr gering.

Nach *König*[3]) ist die mittlere Zusammensetzung des Kuhmilchkolostrums:

Wasser	75·07%
Trockensubstanz	24·93%
Kasein	4·19%
Albumin und Globulin	12·99%
Fett	3·97%
Zucker	2·28%
Asche	1·53%

Die Zusammensetzung des Kolostrums der Frauenmilch unterscheidet sich von der gewöhnlichen Frauenmilch durch ein erhöhtes spezifisches Gewicht und durch einen viel größeren Gehalt an Eiweiß und Asche, besonders an Alkali.

Wie bei jeder chemischen Analyse ist auch bei der Untersuchung der Milch die Entnahme des Untersuchungsmateriales von großer Wichtigkeit. Bei der polizeilichen Milchkontrolle, wo es sich um den Nachweis der verschiedenen Verfälschungen und Verwässerungen handelt, ist die Art der Entnahme des Analysenmaterials eventuell vor Zeugen oder auch an Ort und Stelle (Stallprobe) von entscheidender Bedeutung. Auch für wissenschaftliche Untersuchungen muß die Milch in bestimmter Art zur Analyse

[1]) *Umikoff*, Zur differenziellen chemischen Reaktion der Frauen- und Kuhmilch und über die Bestimmung der Laktationsdauer der Frauenbrust. Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 42. 356. 1896.

[2]) *Reyher*, Über den Fettgehalt der Frauenmilch. Jahrbuch f. Kinderheilk. Bd. 61. 601. 1905.

[3]) *König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Berlin. 2. 603. 1904.

entnommen werden. Vor allem muß darauf gesehen werden, daß eine richtige Durchschnittsprobe vorliegt, und daß ferner die Milch bis zum Zeitpunkt der Analyse an einem kühlen Ort aufbewahrt wird.

Fig. 106.

Es ist zu empfehlen, die Milch sofort zwecks Analyse zu verarbeiten. Ist dies nicht möglich, so soll man sie längstens 2 Tage in einem gut funktionierenden Eisschrank stehen lassen.

Es ist unbedingt zu vermeiden, daß sie gerinnt, weil sie in diesem Falle nicht genau abgemessen werden kann, und die Entnahme einer Durchschnittsprobe erschwert wird. Ist sie doch geronnen, so kann man sie für viele Zwecke der Analyse noch immer gebrauchen, z. B. für die Bestimmung der Mineralbestandteile. Sie muß aber vorher tüchtig durchgerührt, am besten in einem Schüttelapparat durchgeschüttelt werden.

Muß die Milch aus irgend welchen Gründen längere Zeit stehen bleiben, so empfiehlt es sich, sie zu konservieren. Als Konservierungsmittel kommen in Betracht: Kaliumbichromat, Kupferammoniumsulfat, Formalin u. a. Die Wahl des Konservierungsmittels richtet sich meistens danach, was man in der Milch bestimmen will.

Formalin, die wässerige 40%ige Lösung des Formaldehyds, ist zur Konservierung sehr gut brauchbar; am besten durch einen Zusatz von 0·05%. Man wird es meistens dann anwenden, wenn man auch die Mineralanalyse ausführen will, was man bei Gebrauch von Kaliumbichromat oder Kupferammoniumsulfat selbstverständlich nicht machen kann.

Auch Kaliumbichromat ist zur Konservierung von Milch zu empfehlen. Nach *Eichloff*[1]) wendet man am besten eine Lösung von 1·032 spezifischem Gewicht an, und zwar setzt man auf 100 *cm*³ Milch 1 *cm*³ dieser Lösung zu. Nach *Weibull*[2]) erschwert das Kaliumbichromat wie überhaupt jedes Konservierungsmittel die *Gottlieb*sche Fettbestimmung.

Kupferammoniumsulfat, in einer Menge von 0·5—2 *g* auf 1 *l* angewandt, schützt die Milch bei kühler Aufbewahrung sehr gut einige Wochen lang vor Zersetzung.

Es ist viel genauer, die zur Analyse verwendete Milchprobe zu wägen als abzumessen. Man verwendet dazu eine kleine Spritzflasche, die auch in Grade eingeteilt sein kann. Sie wird vor und nach der Entnahme der Probe gewogen.

Bestimmung des spezifischen Gewichtes.

Diese Bestimmung kann man mit dem Laktodensimeter ausführen.

[1]) *Eichloff*, Über die Bestimmung des spezifischen Gewichts der mit Kaliumbichromat konservierten Milch. Milch-Zeitung. 25. 511. 1896.

[2]) *Weibull*, Eine Beobachtung bei der *Gottlieb*schen Methode der Fettbestimmung. Zeitschr. f. Untersuch. der Nahrungs- u. Genußmittel. 17. 442. 1909.

Das Laktodensimeter (nach *Soxhlet*, Fig. 106), ein bei 15° geaichtes Aräometer, gibt direkt das spezifische Gewicht der Milch an. Man gießt die gut durchgerührte Milch in weite Standzylinder, senkt das Densimeter ein und achtet darauf, daß es sich freischwebend bewegen kann. Man wartet eine kurze Zeit und liest dann die Stelle, bis zu welcher das Aräometer eintaucht, und zwar am unteren Meniskus ab. Da das Laktodensimeter auf die Normaltemperatur von 15° geaicht ist, so muß entweder die Milch dieselbe Temperatur besitzen, oder man muß an der abgelesenen Zahl eine Korrektur vornehmen. Die Korrektur beträgt für 5° Temperaturdifferenz 0·001. Bei Temperaturen unter 15° zieht man für jeden Temperaturgrad 0·0002 ab; bei Temperaturen über 15° addiert man diese Zahl zur abgelesenen. Für ganz genaue Bestimmungen kann man sich selbstverständlich auch des Pyknometers oder der *Westphal*schen Wage bedienen.[1])

Ist die Milch bereits geronnen und hat sie nicht allzu lange gestanden, so kann man nach *Weibull*[2]) die Milch wieder mit Ammoniak verflüssigen und in dieser Milchammoniakmischung die Bestimmung des spezifischen Gewichtes vornehmen. Die geronnene Milch rührt man gut durch, pipettiert dann 100 cm^3 in einen Erlenmeyerkolben und gibt 10 cm^3 Ammoniak zu. Man schließt den Kolben gut zu, wartet so lange, bis die Milch vollkommen verflüssigt ist, mißt das Volumen der ammoniakalischen Flüssigkeit und bestimmt in dieser Mischung das spezifische Gewicht.

Kennt man das Volumen der ursprünglich geronnenen Milch, das Volumen und das spezifische Gewicht des hinzugesetzten Ammoniaks, das Volumen der Milchammoniakmischung und das spezifische Gewicht derselben, so kann man daraus leicht das spezifische Gewicht der ursprünglichen Milch berechnen.

Nach *Teichert*[3]) erhält man nach diesem Verfahren etwas zu hohe Werte.

Zur Ermittlung des spezifischen Gewichtes des Milchserums stellt man sich dasselbe her, indem man 100 cm^3 Milch mit 2 cm^3 verdünnter (20%) Essigsäure versetzt und auf 40° erwärmt. Das spezifische Gewicht wird mittelst Pyknometers bestimmt.

Bestimmung der Trockensubstanz.

10 *g* Milch werden in einer Platin- oder Nickelschale (auch Porzellanschale) mit 1 Tropfen Essigsäure und 10 cm^3 Alkohol versetzt, auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, in einem Lufttrockenschrank bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen.[4]) Man kann auch

[1]) Genaues über Bestimmungen des spezifischen Gewichtes: *Biehringer*, Bd. 1, 437 dieses Handbuches.

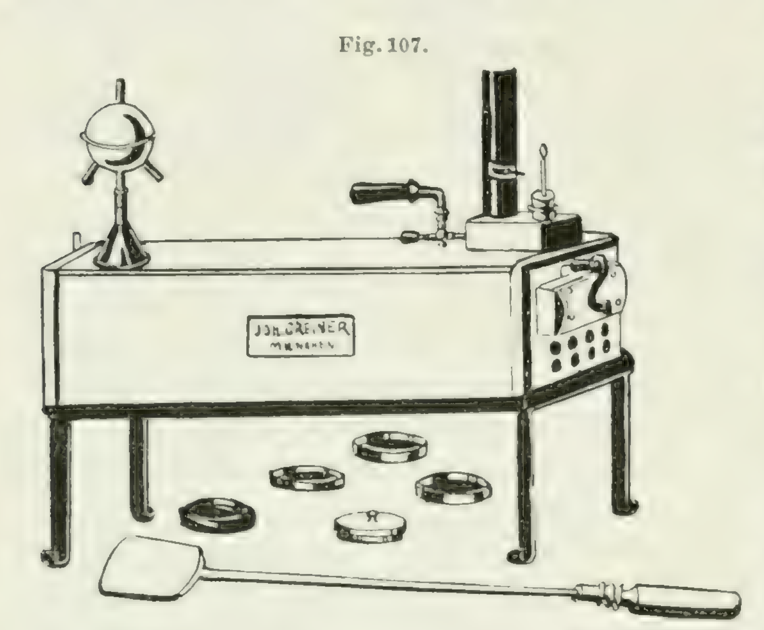
[2]) *Weibull*, Beiträge zur Analyse der Milch; kann man das spezifische Gewicht einer Milch, die geronnen ist, genau bestimmen? Chem. Zeitung. 17. 1670. 1893.

[3]) *Teichert*, Methoden zur Untersuchung von Milch- und Molkereiprodukten. Stuttgart. 46. 1909.

[4]) Die zulässige Fehlergrenze zweier Kontrollbestimmungen ist 0·15%.

das Trocknen im Vakuum vornehmen. Am besten bedient man sich sowohl zum Eindunsten sowie zum Trocknen der Milch des nach *Soxhlet* von *Johannes Greiner,* München, konstruierten Trockenofens (Fig. 107), welcher mit 55%igem Glyzerin geheizt wird. Der Vorteil dieses Ofens besteht darin, daß die Temperatur bis höchstens 103° aufsteigt und die Trockensubstanz nicht gebräunt wird, was bei dem gewöhnlichen Trocknen durch den Karamelisierungsprozeß des Milchzuckers unvermeidlich ist. Will man größere Milchmengen eindampfen, bedient man sich verschiedener Aufsaugungsmittel wie Gips, Glaspulver, geglühten Quarzsand oder Seesand. Nimmt man das Eintrocknen in einem *Vogel*schen Blechschiffchen vor [1]), so kann man zur gleichen Zeit eine Fettbestimmung daran anschließen. *Fleischmann* [2]) empfiehlt, die Trockensubstanz aus der von ihm angegebenen Formel zu errechnen, und zwar aus dem Grunde, weil nach seiner Meinung die hornartig eingetrockneten Eiweißkörper kleine Mengen Wasser einschließen, die durch noch so sorgfältiges Trocknen nicht zu entfernen sind, und weil die durch langes Trocknen eintretenden Oxydationen Ungenauigkeiten ergeben.

Fig. 107.



Unter der Voraussetzung, daß das spezifische Gewicht des Milchfettes bei 15° 0·93 im Durchschnitt beträgt und das der fettfreien Trockensubstanz 1·6, kann man aus dem spezifischen Gewicht und dem Fettgehalt der Milch den Prozentgehalt der Trockensubstanz aus folgender von *Fleischmann* aufgestellten Formel berechnen:

$$t = 1{\cdot}2 \,.\, f + 2{\cdot}665 \,.\, \frac{100 \,.\, s - 100}{s}$$

worin t = den Prozentgehalt der Trockensubstanz, f = den Prozentgehalt des Fettes und s = das spezifische Gewicht der Milch bedeutet.

Diese Formel hat nur für Vollmilch Gültigkeit. *Fleischmann* hat die Werte für f von 2·5—5·5% und die für s von 1·0280—1·0369 in die Formel eingesetzt und daraus eine Tabelle zusammengestellt. Derselbe

[1]) Die Anwendung des *Vogel*schen Schiffchens hat außerdem noch den Vorteil, daß man es in ein Wägegläschen (von bekanntem Gewicht) hineinschiebt und so zur Wägung bringt. Dadurch wird die Trockensubstanz, die sehr hygroskopisch ist, vor Wasseraufnahme während des Wägens geschützt.

[2]) *Fleischmann,* Lehrb. der Milchwirtschaft. Leipzig, Heinsius Nachfolger. 63 und 67. 1908.

Tabelle I.

Tabelle zur Ermittlung der Trockensubstanz der Milch nach *Fleischmann.*

s Tausendstel	$2{\cdot}665 \frac{100 . s - 100}{s}$	s Tausendstel	$2{\cdot}665 \frac{100 . s - 100}{s}$	s Tausendstel	$2{\cdot}665 \frac{100 . s - 100}{s}$
28·0	7·256	31·0	8·014	34·0	8·765
1	7·283	1	8·040	1	8·786
2	7·309	2	8·064	2	8·812
3	7·333	3	8·088	3	8·837
4	7·360	4	8·112	4	8·863
5	7·384	5	8·138	5	8·887
6	7·408	6	8·163	6	8·913
7	7·432	7	8·186	7	8·937
8	7·462	8	8·213	8	8·962
9	7·486	9	8·238	9	8·988
29·0	7·513	32·0	8·264	35·0	9·012
1	7·533	1	8·288	1	9·037
2	7·560	2	8·312	2	9·061
3	7·586	3	8·338	3	9·088
4	7·611	4	8·365	4	9·112
5	7·635	5	8·388	5	9·135
6	7·659	6	8·412	6	9·162
7	7·686	7	8·439	7	9·185
8	7·712	8	8·463	8	9·210
9	7·736	9	8·487	9	9·234
30·0	7·763	33·0	8·513	36·0	9·260
1	7·786	1	8·538	1	9·287
2	7·813	2	8·563	2	9·311
3	7·837	3	8·589	3	9·335
4	7·861	4	8·613	4	9·359
5	7·888	5	8·639	5	9·383
6	7·912	6	8·664	6	9·410
7	7·938	7	8·688	7	9·434
8	7·962	8	8·712	8	9·460
9	7·989	9	8·738	9	9·484

Forscher hat festgestellt, daß das spezifische Gewicht der fettfreien Trockenmasse annähernd konstant ist, und daß es möglich ist, eine der 3 Größen (Fettgehalt, Trockenmasse und das spezifische Gewicht) durch Rechnung zu ermitteln, wenn 2 derselben bekannt sind.

Gleichung für die Fettberechnung:

$$f = 0{\cdot}833 \,.\, t - 2{\cdot}22 \cdot \frac{100 \,.\, s - 100}{s}.$$

Gleichung für das spezifische Gewicht:

$$s = \frac{1000}{1000 - 3{\cdot}75\,(t - 1{\cdot}2 \,.\, f)}$$

Witte[1]) schlägt vor, das spezifische Gewicht der Milchtrockensubstanz aus dem Fettgehalte derselben so auszurechnen: Die Prozente Fett zwischen

[1]) *Witte,* Fettgehalt und spez. Gewicht der Milchtrockensubstanz. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel. 18. 464. 1909.

Tabelle II.

Tabelle zur Ermittlung der Trockensubstanz nach *Fleischmann*.

f	1·2 . f	f	1·2 . f	f	1·2 . f	f	1·2 . f	f	1·2 . f	f	1·2 . f
2·50	3·000	3·00	3·600	3·50	4·200	4·00	4·800	4·50	5·400	5·00	6·000
51	3·012	01	3·612	51	4·212	01	4·812	51	5·412	01	6·012
52	3·024	02	3·624	52	4·224	02	4·824	52	5·424	02	6·024
53	3·036	03	3·636	53	4·236	03	4·836	53	5·436	03	6·036
54	3·048	04	3·648	54	4·248	04	4·848	54	5·448	04	6·048
55	3·060	05	3·660	55	4·260	05	4·860	55	5·460	05	6·060
56	3·072	06	3·672	56	4·272	06	4·872	56	5·472	06	6·072
57	3·084	07	3·684	57	4·284	07	4·884	57	5·484	07	6·084
58	3·096	08	3·696	58	4·296	08	4·896	58	5·496	08	6·096
59	3·108	09	3·708	59	4·308	09	4·908	59	5·508	09	6·108
2·60	3·120	3·10	3·720	3·60	4·320	4·10	4·920	4·60	5·520	5·10	6·120
61	3·132	11	3·732	61	4·332	11	4·932	61	5·532	11	6·132
62	3·144	12	3·744	62	4·344	12	4·944	62	5·544	12	6·144
63	3·156	13	3·756	63	4·356	13	4·956	63	5·556	13	6·156
64	3·168	14	3·768	64	4·368	14	4·968	64	5·568	14	6·168
65	3·180	15	3·780	65	4·380	15	4·980	65	5·580	15	6·180
66	3·192	16	3·792	66	4·392	16	4·992	66	5·592	16	6·192
67	3·204	17	3·804	67	4·404	17	5·004	67	5·604	17	6·204
68	3·216	18	3·816	68	4·416	18	5·016	68	5·616	18	6·216
69	3·228	19	3·828	69	4·428	19	5·028	69	5·628	19	6·228
2·70	3·240	3·20	3·840	3·70	4·440	4·20	5·040	4·70	5·640	5·20	6·240
71	3·252	21	3·852	71	4·452	21	5·052	71	5·652	21	6·252
72	3·264	22	3·864	72	4·464	22	5·064	72	5·664	22	6·264
73	3·276	23	3·876	73	4·476	23	5·076	73	5·676	23	6·276
74	3·288	24	3·888	74	4·488	24	5·088	74	5·688	24	6·288
75	3·300	25	3·900	75	4·500	25	5·100	75	5·700	25	6·300
76	3·312	26	3·912	76	4·512	26	5·112	76	5·712	26	6·312
77	3·324	27	3·924	77	4·524	27	5·124	77	5·724	27	6·324
78	3·336	28	3·936	78	4·536	28	5·136	78	5·736	28	6·336
79	3·348	29	3·948	79	4·548	29	5·148	79	5·748	29	6·348
2·80	3·360	3·30	3·960	3·80	4·560	4·30	5·160	4·80	5·760	5·30	6·360
81	3·372	31	3·972	81	4·572	31	5·172	81	5·772	31	6·372
82	3·384	32	3·984	82	4·584	32	5·184	82	5·784	32	6·384
83	3·396	33	3·996	83	4·596	33	5·196	83	5·796	33	6·396
84	3·408	34	4·008	84	4·608	34	5·208	84	5·808	34	6·408
85	3·420	35	4·020	85	4·620	35	5·220	85	5·820	35	6·420
86	3·432	36	4·032	86	4·632	36	5·232	86	5·832	36	6·432
87	3·444	37	4·044	87	4·644	37	5·244	87	5·844	37	6·444
88	3·456	38	4·056	88	4·656	38	5·256	88	5·856	38	6·456
89	3·468	39	4·068	89	4·668	39	5·268	89	5·868	39	6·468
2·90	3·480	3·40	4·080	3·90	4·680	4·40	5·280	4·90	5·880	5·40	6·480
91	3·492	41	4·092	91	4·692	41	5·292	91	5·892	41	6·492
92	3·504	42	4·104	92	4·704	42	5·304	92	5·904	42	6·504
93	3·516	43	4·116	93	4·716	43	5·316	93	5·916	43	6·516
94	3·528	44	4·128	94	4·728	44	5·328	94	5·928	44	6·528
95	3·540	45	4·140	95	4·740	45	5·340	95	5·940	45	6·540
96	3·552	46	4·152	96	4·752	46	5·352	96	5·952	46	6·552
97	3·564	47	4·164	97	4·764	47	5·364	97	5·964	47	6·564
98	3·576	48	4·176	98	4·776	48	5·376	98	5·976	48	6·576
99	3·588	49	4·188	99	4·788	49	5·388	99	5·988	49	6·588

Für Tausendstel von f ist zu addieren	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	0·001	0·002	0·004	0·005	0·006	0·007	0·008	0·010	0·011

19·1 und 20·2 entsprechen einem spezifischen Gewicht von 1·40 und jedes Zunehmen des Fettgehaltes um 1·1% enstpricht einem Sinken des spezifischen Gewichtes um 0·01%.

Gleichung für die fettfreie Trockensubstanz:

$$R = \frac{d}{4} + \frac{f}{5} + 0{\cdot}26,$$

wobei d den abgelesenen Laktodensimetergrad und f den Fettgehalt bedeutet.

Prozentischer Fettgehalt der Trockensubstanz:

$$P = \frac{100 \,.\, f}{t}.$$

Spezifisches Gewicht der Trockensubstanz:

$$M = \frac{s \,.\, t}{s \,.\, t - (100 \,.\, s - 100)}.$$

Diese Formeln gelten selbstverständlich im allgemeinen nur für normale Kuhmilch.

Fett.

Das Fett befindet sich in der Milch im Zustande einer Emulsion von feinen Tröpfchen. Schüttelt man eine kleine Menge Milch mit Äther, so geht das Fett in den Äther über; durch Verdunsten des Äthers bleibt das Fett zurück. Zur Darstellung eignet sich der beim Reinigen des Kaseins mit Äther erhaltene Fettextrakt. Sämtliche quantitative Bestimmungsmethoden des Fettes beruhen auf dem Prinzip der Extraktion mit Äther.

Das Fett der Kuhmilch besteht aus Glyzeriden der höheren Fettsäuren (Palmitin-, Stearin- und Oleinsäure) und der flüchtigen Fettsäuren, und zwar der Butter-, Kaprin-, Kapron- und Kaprylsäure.

Das Frauenmilchfett enthält außerordentlich geringe Mengen von flüchtigen Fettsäuren.[1])

Im Milchfett sind außerdem noch Lezithin und Cholesterin enthalten.

Fettbestimmung.

Zur Fettbestimmung kann man sich folgender Methoden bedienen:

1. Gewichtsanalytische Bestimmung.
2. Volumetrische Bestimmung.
3. Refraktometrische Bestimmung.
4. Aräometrische Bestimmung.

Gewichtsanalytische Bestimmung.

Methode nach *Vogel*.[2])

Ein kleines Nickelschiffchen wird mit 15—20 *g* ausgeglühtem Sand oder einem anderen porösen Stoff, z. B. Gips, Glaspulver, Asbest, gefüllt.

[1]) *Ruppel*, Über die Fette der Frauenmilch. Zeitschr. f. Biol. 31. 1. 1895; *Laves*, Untersuchung des Fettes von Frauenmilch. Zeitschr. f. physiol. Chem. 19. 3. 69. 1894.

[2]) *Vogel*, Über Milchuntersuchungen. Berlin, Springer, 1885. 6—113.

In dieses so vorbereitete und gewogene Schiffchen werden 10 *g* Milch hineingewogen und die Milch bis zur Trockne eingedampft. Dann umwickelt man das Schiffchen mit fettfreiem Filtrierpapier, legt es in eine Patrone hinein und extrahiert im Soxhletapparat 3—5 Stunden mit wasserfreiem Äther.

Hat man beim Soxhletapparat als Ätheraufnahmegefäß ein kleines Kölbchen benutzt, so kann man, wenn man das Gewicht desselben kennt, den Äther durch Abdampfen verjagen und den Kolben trocknen und wägen. Sonst führt man die Ätherflüssigkeit quantitativ in ein vorher gewogenes Bechergläschen über (2—3mal mit Äther nachspülen!), verdampft die Ätherfettlösung vorsichtig auf einem Dampfbad, trocknet das Bechergläschen bei 100° 1 Stunde lang und wägt. Die Gewichtszunahme bedeutet den Fettgehalt.

Eine höhere Temperatur als 100° beim Trocknen ist möglichst zu vermeiden wegen der damit verbundenen Gefahr der Fettzersetzung.

Methode nach *Adams*.[1])

Eine etwas umständliche Methode ist die nach *Adams*, welche aber sonst sehr brauchbare Resultate liefert.

Man tropft 6—7 *g* Milch (das genaue Abwägen kann man sich durch eine kleine abtarierte und mit Strichen versehene Spritzflasche erleichtern) auf einen 56 *cm* langen Filtrierpapierstreifen (*Schleicher & Schüll*) auf, und zwar so, daß man den Papierstreifen (der übrigens selbstverständlich fettfrei ist) schwebend an beiden Enden mit Klammern befestigt. Nun tropft man die Milch allmählich auf, wobei man achtgibt, daß die beiden Ecken in einer Entfernung von mindestens 5 *cm* trocken bleiben. Man läßt den Papierstreifen an der Luft trocknen, rollt ihn vorsichtig zusammen, trocknet ihn nochmals 2 Stunden bei 100° und extrahiert im Soxhletapparat 5—8 Stunden.

Die ätherische Lösung wird genau so wie sonst in einem gewogenen Kölbchen verdunstet und nach dem üblichen Trocknen gewogen.

Nach *Gottlieb-Röse*.[2])

Prinzip: Die Eiweißstoffe bzw. das Kasein der Milch werden in Ammoniak gelöst und aus einer ammoniakalisch-alkoholischen Lösung das Fett mit Äther-Petroläther durch Ausschütteln extrahiert.

10 *g* Milch werden in einem genau graduierten Zylinder oder in besonders zu diesem Zwecke hergestellten graduierten und mit geschliffenen Stöpseln versehenen Schüttelbüretten[3]) (Fig. 108) zunächst mit 2 *cm*³ eines 10%igen Ammoniaks versetzt und leicht geschüttelt.

[1]) *Lenz*, Bericht über spezielle analytische Methoden. Zeitschr. f. analyt. Chem. 27. 85. 1888.

[2]) *Röse*, Zur Analyse der Milch; Fettbestimmung. Zeitschr. f. angewandte Chem. 1. 100. 1888; *Gottlieb*, Eine bequeme Methode zur Bestimmung des Fettes in der Milch. Landwirtschaftliche Versuchsstationen. 40. 1. 1892.

[3]) Den sogenannten *Gottlieb*schen Röhren (Fig. 108).

Nun werden nacheinander 10 cm^3 absoluter Alkohol, 25 cm^3 absoluter Äther und 25 cm^3 Petroläther hinzugefügt und nach jeder Zugabe gut durchgeschüttelt. Nach kurzer Zeit trennt sich die wässerig-ammoniakalische Schicht von der ätherischen und man läßt den Zylinder einige Stunden stehen. Dann wird die Höhe der ätherischen Schicht abgelesen und ein aliquoter Teil derselben (20 oder 30 cm^3) mit einer Pipette entnommen (die Pipette wird nachgespült!), in ein gewogenes kleines Bechergläschen hineingebracht und der Äther auf einem Dampfbad vorsichtig abgedampft. Das Bechergläschen wird bei 100° eine Stunde lang getrocknet und gewogen.

Fig. 108.

Die in der entnommenen Menge Ätherlösung zum Wägen gebrachte Grammanzahl Fett wird auf die ganze Ätherschicht umgerechnet. Die Zahl gibt dann die in den abgewogenen 10 *g* Milch enthaltene Menge Fett.

Statt die Milch abzuwägen, kann man auch 10 cm^3 Milch verwenden, hebert aber die ätherische Lösung bis auf 1·5 cm^3 der Fettlösung ab. Die nach dem Verdunsten des Äthers gewogene Fettmenge mit 10 multipliziert gibt dann direkt Gewichtsprozente an.[1])

In neuerer Zeit haben *Hesse*[2]) und *Eichloff*[3]) das *Gottlieb-Röse*sche Verfahren abgeändert. Die *Gottlieb*sche Methode liefert zu niedrige Werte. *Hesse* schlägt deshalb vor, die ätherische Fettlösung ganz abzuhebern, mit Äther einmal nachzuspülen und noch einmal mit Äther und Petroläther auszuschütteln. Da aber das zweite Ausschütteln sehr geringe Mengen Fett liefert, genügt es nach *Eichloff* und *Grimmer*[3]), wenn man nach dem Abhebern der Fettlösung zweimal mit Äther nachspült. Graduierte Zylinder fallen für diese Methode weg, da man ja nicht mehr aliquote Teile, sondern die ganze Ätherschicht abhebert und eine Umrechnung unnötig wird.

Der Schüttelkolben[4]) (vergl. Fig. 109, S. 434) wird leer gewogen, mit 10 cm^3 Milch gefüllt und abermals gewogen. Dann wird 1 cm Ammoniak hinzugefügt und leicht umgeschüttelt. Nun setzt man nacheinander 10 cm^3 absoluten Alkohol, 25 cm^3 wasserfreien Äther und 25 cm^3 Petroläther dazu, schüttelt nach jeder Zugabe kräftig um und läßt 6 Stunden stehen. Man hebert jetzt die ganze Ätherschicht in einen kleinen (150 cm^3) gewogenen Erlenmeyerkolben, spült den Apparat zweimal mit je 25 cm^3 Äther nach, verdampft die Lösung, trocknet bei 105° und wägt.

[1]) *Röttger*, Lehrbuch der Nahrungsmittel-Chemie. Verlag J. Springer. S. 184. 1907.

[2]) *Hesse*, Untersuchungen über die *Gottlieb*sche Fettbestimmung. Molkerei-Ztg. 17. 277.

[3]) *Eichloff* und *Grimmer*, Abgeändertes Verfahren zur Bestimmung des Fettgehaltes nach *Röse-Gottlieb* in Milch- und Molkereiprodukten. Milchwirtschaftl. Zentralblatt. 6. 114. 1910.

[4]) Vertrieb des Apparates durch *P. Funke & Co.*, Berlin.

Die *Gottlieb-Röse*sche Methode ist zurzeit die beste und genaueste, ihre Ausführung ist leicht und erfordert wenig Zeit.

Volumetrische Bestimmung.

Nach *Gerber*.[1])

Versetzt man Milch mit konzentrierter Schwefelsäure, so lösen sich unter starker Wärmeentwicklung das Kasein und die Nichtfette. Das Fett scheidet sich ab und wird in dem gleichzeitig zugesetzten Amylalkohol gelöst.

In für diesen Zweck hergestellte Gefäße (Butyrometer Fig. 110 u. 111) werden 10 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure vom spezifischen Gewicht 1·82—1·825, ferner vorsichtig 11 cm^3 Milch und 1 cm^3 Amylalkohol (Siedepunkt 128 bis 130°) eingetragen, die Butyrometer mit dicht schließenden Gummistöpseln zugestöpselt und kräftig umgeschüttelt. Dann zentrifugiert man 5 Minuten in einer hierfür hergestellten Zentrifuge (Fig. 112 u. 113) und erwärmt die Röhrchen kurze Zeit in einem Wasserbad von 60—70°.[2]) Stellt man durch Drehen des Kautschukstopfens den Meniskus so ein, daß er mit einem Hauptstrich der Skala zusammenfällt, so kann man direkt die Prozente Fett ablösen.

Fig. 110. Fig. 111.

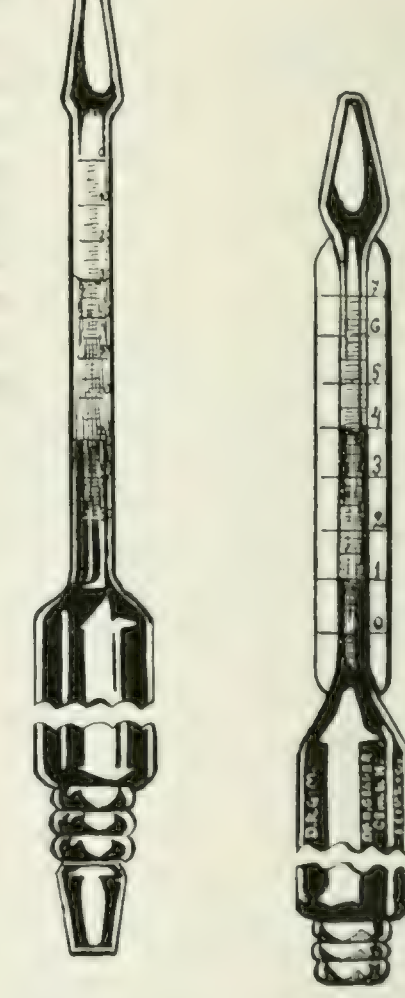
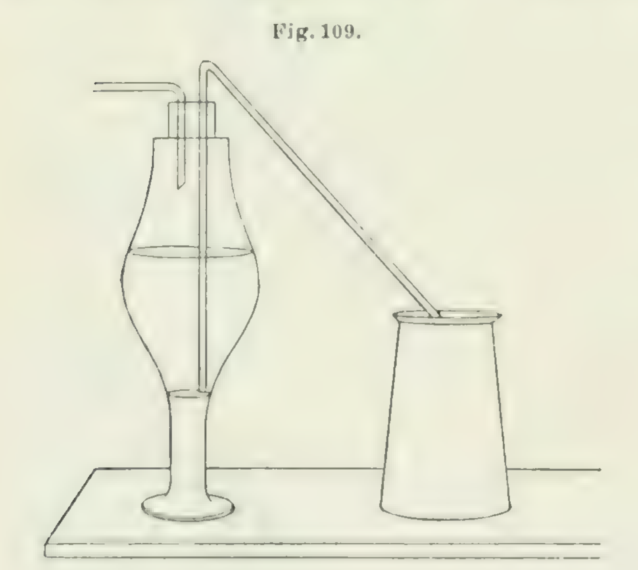


Fig. 109.



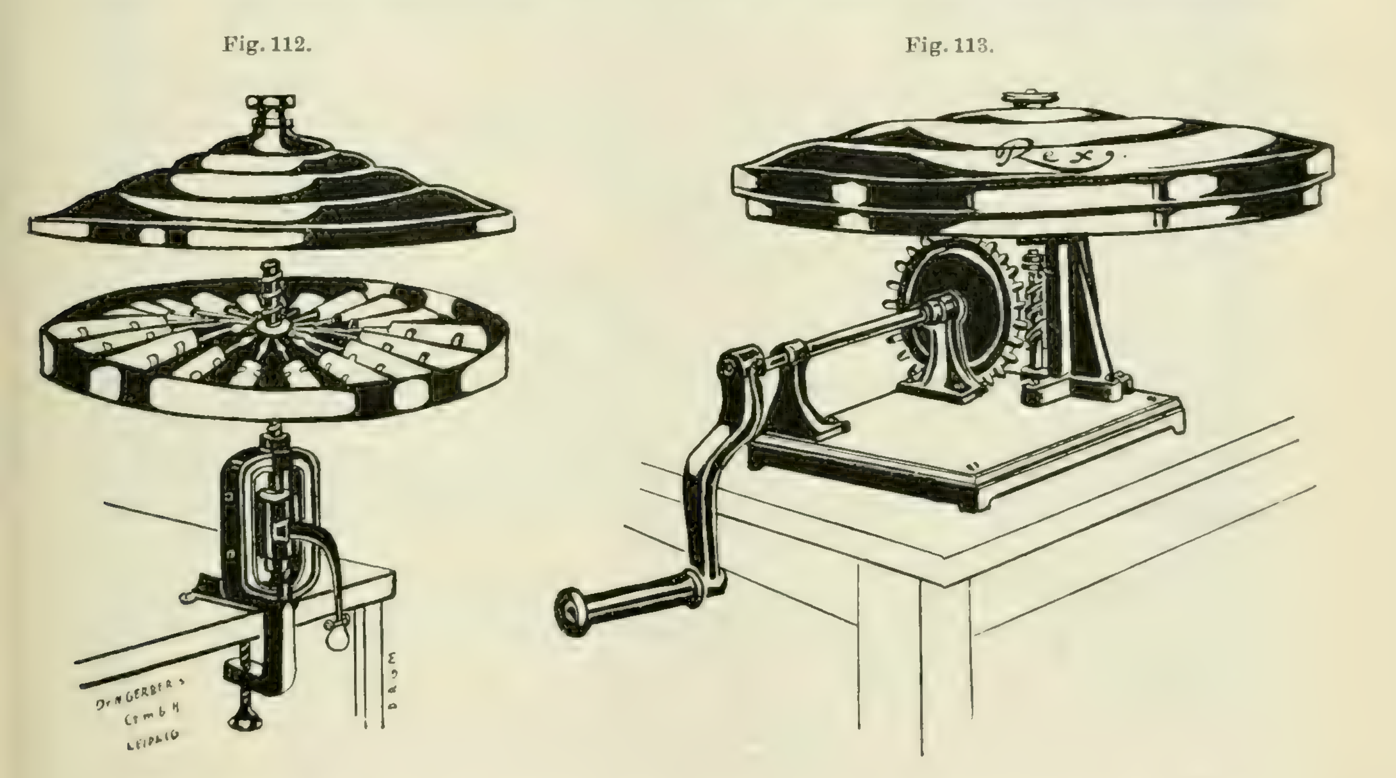
[1]) *Gerber*, Die Azidbutyrometrie als Universalfettbestimmungsmethode. Chem. Ztg. 16. 1839. 1892.

[2]) Nach *Stein* soll man nach dem Schleudern nicht mehr erwärmen. Vergleichende Untersuchungen einiger Methoden zur Untersuchung des Fettes in der Milch. Milchwirtschaftl. Zentralbatt. V. 209. 1909.

Höyberg[1]) hat zwecks besserer Ablesung der Fettschicht vorgeschlagen, dem Amylalkohol einen Farbstoff zuzusetzen, und zwar eine 2%ige alkoholische Lösung von Sudan III im Verhältnis von $^{1}/_{10}$ des Volumens. Die Fettschicht erscheint dann schön orange, die untere (schwefelsaure) Schicht violett gefärbt.

Die Methode nach *Gerber* eignet sich sehr gut für schnelle Fettbestimmungen und wird besonders in der Molkereipraxis viel verwendet. Sie liefert sehr gute Werte. Vom Verfasser angestellte Versuche an 8 Proben nicht fettreicher Frauenmilch (2—3·5%), in denen Fett nach *Gottlieb* und

Fig. 112. Fig. 113.



Gerber bestimmt wurde, haben eine sehr gute Übereinstimmung beider Methoden ergeben.

Nach Untersuchungen von *A. Stein*[2]) unterscheiden sich die Werte nach *Gerber* und die aus der aräometrischen Methode nach *Soxhlet* höchstens um 0·05%.

Zum Ablesen eignen sich gut die Flachbutyrometer.

Eine Modifikation der *Gerber*schen Azidobutyrometrie ist seine Salmethode.[3]) Dieselbe vermeidet die Anwendung von Schwefelsäure und den Gebrauch des Amylalkohols. Das Prinzip ist wie folgt:

Eine alkalische Sallösung (das Salpulver besteht aus Ätznatrium und Kaliumnatriumtartrat, etwas Kochsalz und einem roten Farbstoff) löst das

[1]) *Höyberg*, Eine Methode zur Färbung des bei der *Gerber*schen Azidobutyrometrie abgeschiedenen Milchfettes. Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhygiene. 21. 46. 1910; zitiert nach Chem. Zentralbl. II. 1725. 1910.

[2]) *A. Stein*, l. c.

[3]) *Gerber*, Die „Sal"-Methode, ein neues säurefreies Verfahren zur schnellen Fettbestimmung aller Milcharten. Milch-Ztg. 35. 37. 1906.

Kasein der Milch und die Kalksalze derselben. Das Fett wird wie bei der vorherigen Bestimmung durch Zentrifugieren abgeschieden. Dasselbe wird in dem zugegebenen Isobutylalkohol gelöst und erscheint über der rotgefärbten alkalischen Lösung als farblose Fettschicht.

Die Bestimmung wird folgendermaßen ausgeführt:

11 *cm*³ Sallösung (hergestellt durch Lösen des käuflichen Salpulvers in 1 *l* Wasser und nachträglicher Filtration), 10 *cm*³ Milch und 0·6 *cm*³ „Butyl" (Isobutylalkohol) werden in ein *Gerber*sches Butyrometer gebracht, tüchtig durchgeschüttelt, in einem Wasserbade von 45° 3 Minuten erwärmt und wieder durchgeschüttelt. Dann zentrifugiert man 3 Minuten lang, bringt wieder auf kurze Zeit in ein Wasserbad von 45° und liest ab.

Auf ähnlichem Prinzip beruht das Verfahren nach *Sichler*[1], die sogenannte Synazidbutyrometrie und die Neusalmethode nach *Wendler*.[2] Die letztere prüften *Nottbohm* und *Angerhausen*[3]) nach und fanden, daß sie recht gute Ergebnisse liefert, und zwar mit der *Gottlieb-Röse*schen Methode verglichen.

Neusal ist eine Mischung von salizylsauren und zitronensauren Salzen und einem blauen Farbstoff. 250 *g* davon werden in 600 Wasser gelöst, 250 Neusalalkohol dazugegeben und mit Wasser auf 2 *l* aufgefüllt.[4] 12 *cm*³ dieser Neusallösung werden mit 9·9 *cm*³ Milch in einem Butyrometer gut geschüttelt, auf 3 Minuten in ein Wasserbad von 50° gebracht, nochmals geschüttelt und wieder 3 Minuten auf 50° erwärmt. Dann zentrifugiert man 3 Minuten, erwärmt auf 45° und liest ab.

Über den Wert der beiden letzten Methoden kann man sich noch kein abschließendes Urteil erlauben. Bei genauen Bestimmungen soll man sich jedenfalls der anderen, bewährten Methoden bedienen.

Das refraktometrische Verfahren nach Wollny.

Modifikation nach *Naumann*.[5]

Stellt man sich nach bestimmter Vorschrift eine Ätherfettlösung her und bestimmt die Lichtbrechung, die ein Lichtstrahl beim Durchgang durch diese Schicht erleidet, so kann man, vorausgesetzt, daß der Brechungsexponent des Milchfettes einen konstanten Wert hat, aus einer empirisch berechneten Tabelle die Fettmenge bestimmen.[6]

---

[1] *Sichler* und *Richter*, Ein Beitrag zur Beurteilung der Synazidbutyrometrie. Milchwirtsch. Zentralbl. 1. 71. 1905.

[2] *Wendler*, „Neusal". Neues säure- und alkalifreies Verfahren. Milchzeitung. 39. 230. 1910.

[3] *Nottbohm* und *Angerhausen*, Nachprüfung der „Neusalmethode von Dr. *Wendler*" zur Fettbestimmung in der Milch. Zeitschr. f. Untersuch. der Nahrungs- und Genußmittel. 20. 495. 1910.

[4] Diese Lösung ist gebrauchsfertig bei Dr. *Gerber*-Leipzig zu haben.

[5] *Naumann*, Untersuchung der Milch auf den Fettgehalt mit dem *Wollny*schen Milch-Refraktometer. Leipzig 1900. Heinsius Nachf.

[6] Über Refraktometrie siehe: *Biehringer*, Bd. 1. 568 dieses Handbuches.

Tabelle für die Umrechnung der Skalenteile des *Zeiss*schen Milchfettrefraktometers in Fettprozente.

Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	%	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %	Sk.-T.	Fett %
20·0	—	23·0	0·25	26·0	0·57	29·0	0·87	32·0	1·17	35·0	1·50	38·0	1·85	41·0	2·23	44·0	2·63	47·0	3·05	50·0	3·51	53·0	4·01	56·0	4·51	59·0	5·06	62·0	5·63	65·0	6·24
1	—	1	0·26	1	0·58	1	0·88	1	1·18	1	1·51	1	1·87	1	2·24	1	2·64	1	3·06	1	3·53	1	4·03	1	4·53	1	5·08	1	5·65	1	6·27
2	—	2	0·27	2	0·59	2	0·89	2	1·19	2	1·52	2	1·88	2	2·25	2	2·65	2	3·08	2	3·55	2	4·04	2	4·55	2	5·10	2	5·66	2	6·29
3	—	3	0·28	3	0·60	3	0.90	3	1·20	3	1·54	3	1·89	3	2·26	3	2·67	3	3·10	3	3·56	3	4·06	3	4·57	3	5·11	3	5·68	3	6·31
4	—	4	0·29	4	0·61	4	0·91	4	1·22	4	1·55	4	1·90	4	2·27	4	2·68	4	3·12	4	3·57	4	4·07	4	4·59	4	5·13	4	5·70	4	6·34
5	—	5	0·30	5	0·62	5	0·92	5	1·23	5	1·56	5	1·91	5	2·28	5	2·70	5	3·14	5	3·59	5	4·09	5	4·60	5	5·15	5	5·72	5	6·36
6	0·00	6	0·31	6	0·63	6	0·93	6	1·24	6	1·57	6	1·92	6	2·30	6	2·71	6	3·15	6	3·60	6	4·10	6	4·61	6	5·17	6	5·74	6	6·38
7	0·01	7	0·32	7	0·64	7	0·94	7	1·25	7	1·58	7	1·93	7	2·32	7	2·72	7	3·16	7	3·61	7	4·12	7	4·63	7	5·19	7	5·76	7	6·40
8	0·02	8	0·33	8	0·65	8	0·95	8	1·26	8	1·59	8	1·94	8	2·33	8	2·74	8	3·17	8	3·63	8	4·14	8	4·65	8	5·20	8	5·78	8	6·42
9	0·03	9	0·34	9	0·66	9	0·96	9	1·27	9	1·60	9	1·95	9	2·34	9	2·75	9	3·18	9	3·64	9	4·16	9	4·67	9	5·22	9	5·80	9	6·44
21·0	0·04	24·0	0·36	27·0	0·67	30·0	0·97	33·0	1·28	36·0	1·61	39·0	1·96	42·0	2·35	45·0	2·77	48·0	3·20	51·0	3·66	54·0	4·18	57·0	4·69	60·0	5·24	63·0	5·82	66·0	6·46
1	0·05	1	0·37	1	0·68	1	0·98	1	1·29	1	1·62	1	1·98	1	2·37	1	2·78	1	3·21	1	3·67	1	4·20	1	4·71	1	5·26	1	5·84	—	—
2	0·06	2	0·38	2	0·69	2	0·99	2	1·30	2	1·64	2	1·99	2	2·38	2	2·79	2	3·23	2	3·68	2	4·22	2	4·73	2	5·28	2	5·86	—	—
3	0·08	3	0·39	3	0·70	3	1·00	3	1·31	3	1·65	3	2·00	3	2·39	3	2·80	3	3·25	3	3·70	3	4·23	3	4·75	3	5·30	3	5·88	—	—
4	0·09	4	0·40	4	0·71	4	1·01	4	1·32	4	1·66	4	2·02	4	2·40	4	2·82	4	3·27	4	3·72	4	4·25	4	4·76	4	5·32	4	5·90	—	—
5	0·10	5	0·41	5	0·72	5	1·02	5	1·34	5	1·67	5	2·03	5	2·41	5	2·84	5	3·28	5	3·74	5	4·26	5	4·78	5	5·34	5	5·92	—	—
6	0·11	6	0·42	6	0·73	6	1·03	6	1·35	6	1·68	6	2·04	6	2·43	6	2·85	6	3·30	6	3·76	6	4·28	6	4·80	6	5·36	6	5·94	—	—
7	0·12	7	0·43	7	0·74	7	1·04	7	1·36	7	1·69	7	2·05	7	2·44	7	2·87	7	3·32	7	3·78	7	4·29	7	4·82	7	5·38	7	5·96	—	—
8	0·13	8	0·44	8	0·75	8	1·05	8	1·37	8	1·70	8	2·07	8	2·46	8	2·87	8	3·33	8	3·80	8	4·31	8	4·84	8	5·40	8	5·98	—	—
9	0·14	9	0·45	9	0·76	9	1·06	9	1·38	9	1·71	9	2·08	9	2·47	9	2·88	9	3·34	9	3·82	9	4·33	9	4·86	9	5·42	9	6·00	—	—
22·0	0·15	25·0	0·46	28·0	0·77	31·0	1·07	34·0	1·39	37·0	1·72	40·0	2·09	43·0	2·49	46·0	2·90	49·0	3·36	52·0	3·84	55·0	4·35	58·0	4·88	61·0	5·44	64·0	6·02	—	—
1	0·16	1	0·47	1	0·78	1	1·08	1	1·40	1	1·73	1	2·10	1	2·50	1	2·92	1	3·38	1	3·85	1	4·37	1	4·90	1	5·46	1	6·04	—	—
2	0·17	2	0·48	2	0·79	2	1·09	2	1·42	2	1·75	2	2·12	2	2·51	2	2·93	2	3·40	2	3·87	2	4·38	2	4·92	2	5·48	2	6·07	—	—
3	0·18	3	0·49	3	0·80	3	1·10	3	1·43	3	1·76	3	2·13	3	2·52	3	2·94	3	3·42	3	3·89	3	4·40	3	4·94	3	5·50	3	6·09	—	—
4	0·19	4	0·50	4	0·81	4	1·11	4	1·44	4	1·78	4	2·14	4	2·54	4	2·96	4	3·43	4	3·90	4	4·42	4	4·95	4	5·52	4	6·12	—	—
5	0·20	5	0·51	5	0·82	5	1·12	5	1·45	5	1·79	5	2·15	5	2·55	5	2·98	5	3·44	5	3·92	5	4·43	5	4·97	5	5·54	5	6·14	—	—
6	0·21	6	0·52	6	0·83	6	1·13	6	1·46	6	1·80	6	2·16	6	2·56	6	3·00	6	3·45	6	3·93	6	4·44	6	4·98	6	5·56	6	6·16	—	—
7	0·22	7	0·53	7	0·84	7	1·14	7	1·47	7	1·82	7	2·18	7	2·58	7	3·01	7	3·46	7	3·95	7	4·46	7	4·00	7	5·58	7	6·18	—	—
8	0·23	8	0·54	8	0·85	8	1·15	8	1·48	8	1·83	8	2·20	8	2·60	8	3·02	8	3·48	8	3·97	8	4·48	8	5·02	8	5·60	8	6·20	—	—
9	0·24	9	0·55	9	0·86	9	1·16	9	1·49	9	1·84	9	2·21	9	2·61	9	3·03	9	3·50	9	3·99	9	4·49	9	5·04	9	5·61	9	6·22	—	—
23·0	0·25	26·0	0·57	29·0	0·87	32·0	1·17	35·0	1·50	38·0	1·85	41·0	2·23	44·0	2·63	47·0	3·04	50·0	3·51	53·0	4·01	56·0	4·51	59·0	5·06	62·0	5·63	65·0	6·24	—	—

Man stellt die Fettlösung her, indem man 30 *cm*³ einer auf 17·5° gebrachten Milch mit 3 *cm*³ *Wollny*scher Lauge 10 Minuten lang schüttelt. Falls die Milch konserviert war (nach *Naumann* mit Kaliumbichromat in ammoniakalischer Lösung), müssen 12 Tropfen konzentrierter Essigsäure der Probe zugefügt werden. Dann werden 6 *cm*³ wassergesättigten Äthers zugesetzt und 15 Minuten lang in einem Schüttelapparat geschüttelt. Darauf zentrifugiert man 3 Minuten (in einer *Gerber*schen Zentrifuge) und bringt die Mischung wieder auf 17·5°. Diese ganze Prozedur des Mischens, Schüttelns und Zentrifugierens wird in hierfür geeigneten, mit einem Glasstöpsel verschließbaren Probegläschen (Fig. 114) vorgenommen. Ein ganz kleiner Teil von der durch Abzentrifugieren erhaltenen Ätherfettlösung wird mit Hilfe enger Glasröhrchen entnommen und auf das Prisma des Refraktometers aufgetropft.

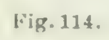


Fig. 114.

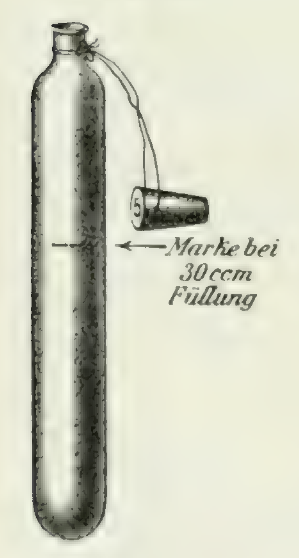
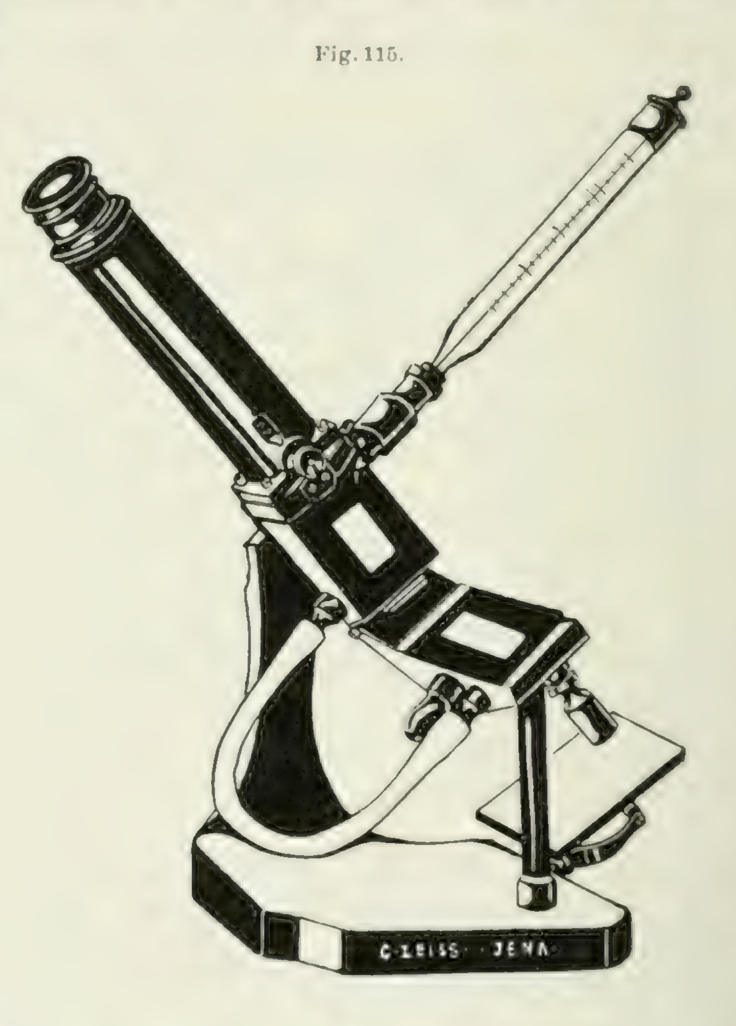


Fig. 115.



Das Refraktometer (Fig. 115) ist genau auf 17·5° eingestellt. Dies wird so bewerkstelligt, daß ein auf 17·5° eingestelltes Wasser durch das Prismengehäuse fließt.

Das Refraktometer wird zunächst so eingestellt, daß es durch Auftropfen von etwas auf 17·5° temperiertem, destilliertem Wasser den Nullpunkt der Skala anzeigt. Dann tropft man auf die sorgfältig gereinigten Prismen wassergesättigten Äther auf und stellt genau durch Regulieren der Mikrometerschraube auf den Skalenteil 20·6 ein.[1])

[1]) Die von der Firma *Zeiss* jetzt gelieferten Milchrefraktometer sind auf diesen Punkt bereits geaicht.

Die *Wollny*sche Lauge stellt man nach *Naumann* her:

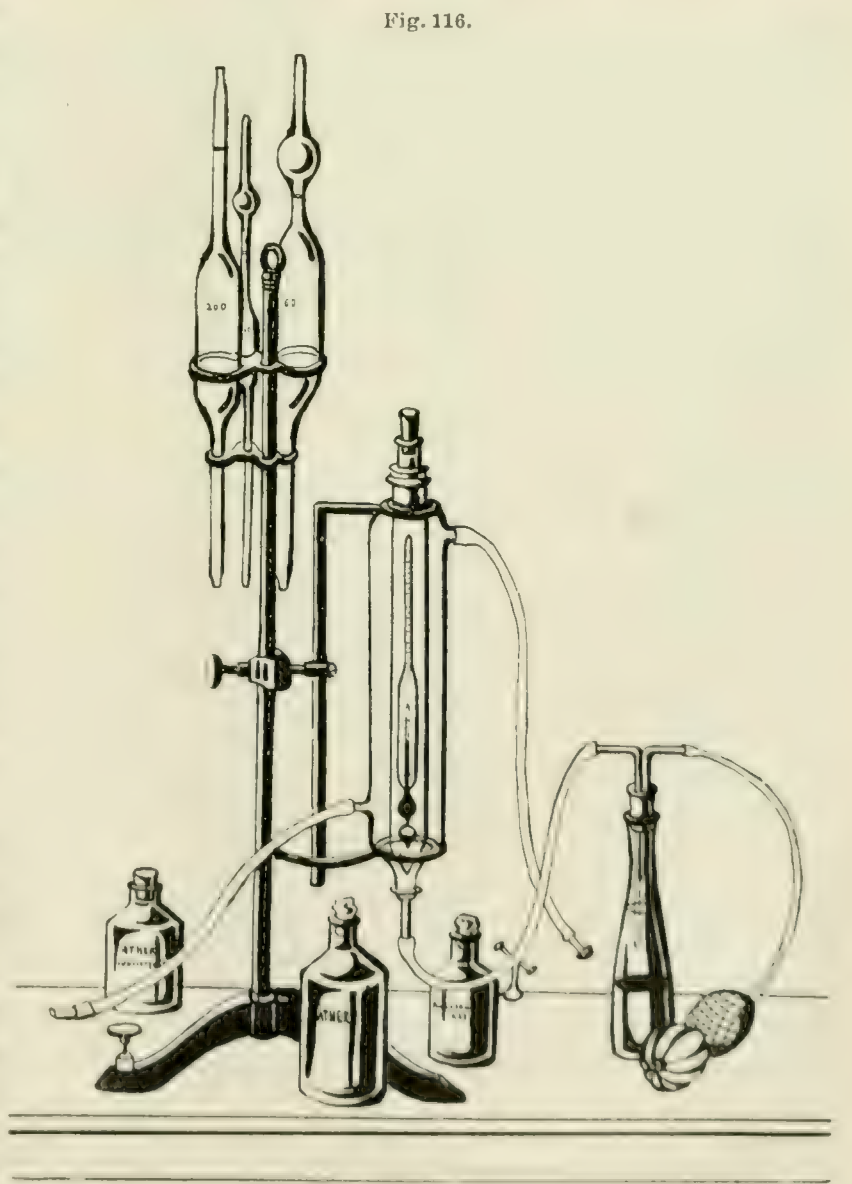
800 *g* KOH in Stangen werden in wenig Wasser gelöst, nach dem Erkalten mit 600 *g* Glyzerin gemischt und dazu 200 *g* Kupferoxyhydrat zugegeben. Diese Mischung wird auf 3000 cm^3 aufgefüllt. Man läßt 3—4 Tage stehen unter zeitweiligem starkem Umschütteln.

Die *Wollny-Naumann*sche Refraktometermethode ist sehr genau, und wenn einmal alles an Reagenzien und Apparaten Notwendige vorbereitet ist, bequem und schnell auszuführen.

Aräometrische Methode nach Soxhlet.[1])

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, daß aus einer alkalisch gemachten Milch das Fett mit wassergesättigtem Äther extrahiert wird. Diese Fettlösung wird auf ihr spezifisches Gewicht untersucht und daraus der Fettgehalt berechnet.

Fig. 116.



Zur Ausführung dieser Bestimmung gehört zunächst der von *Greiner*-München nach *Soxhlet* ausgeführte Apparat (Fig. 116), eine Kalilauge vom spezifischen Gewicht 1·27 und ein wassergesättigter Äther, hergestellt durch Schütteln vom gewöhnlichen Äther (D. 0·7) mit 1—2 Zehntel Volumen Wasser.

Da das Aräometer auf eine Temperatur von 17·5° geaicht ist, muß sowohl die zu untersuchende Milch wie die anzuwendenden Reagenzien auf diese Temperatur gebracht werden.

[1]) *F. Soxhlet*, Aräometrische Methode zur Bestimmung des Fettgehaltes der Milch. Zeitschr. d. landwirtsch. Vereines in Bayern. S. 1. 1880. Referat in der Zeitschr. f. analyt. Chemie. 20. 452. 1881.

Tabelle zur Bestimmung des Fettgehaltes der Milch aus dem spezifischen Gewicht der Ätherfettlösung bei 17·5°.

Spez. Gew.	Fett %	Spez. Gew.	Fett %	Spez. Gew.	Fett %	Spez. Gew.	Fett %	Spez. Gew.	Fett %
43·0	2·07	47·7	2·61	52·3	3·16	56·9	3·74	61·5	4·39
1	2·08	8	2·62	4	3·17	57·0	3·75	6	4·40
2	2·09	9	2·63	5	3·18	1	3·76	7	4·42
3	2·10	48·0	2·64	6	3·20	2	3·78	8	4·44
4	2·11	1	2·66	7	3·21	3	3·80	9	4·46
5	2·12	2	2·67	8	3·22	4	3·81	62·0	4·47
6	2·13	3	2·68	9	3·23	5	3·82	1	4·48
7	2·14	4	2·70	53·0	3·25	6	3·84	2	4·50
8	2·16	5	2·71	1	3·26	7	3·85	3	4·52
9	2·17	6	2·72	2	3·27	8	3·87	4	4·53
44·0	2·18	7	2·73	3	3·28	9	3·88	5	4·55
1	2·19	8	2·74	4	3·29	58·0	3·90	6	4·56
2	2·20	9	2·75	5	3·30	1	3·91	7	4·58
3	2·22	49·0	2·76	6	3·31	2	3·92	8	4·59
4	2·23	1	2·77	7	3·33	3	3·93	9	4·61
5	2·24	2	2·78	8	3·34	4	3·95	63·0	4·63
6	2·25	3	2·79	9	3·35	5	3·96	1	4·64
7	2·26	4	2·80	54·0	3·37	6	3·98	2	4·66
8	2·27	5	2·81	1	3·38	7	3·99	3	4·67
9	2·28	6	2·83	2	3·39	8	4·01	4	4·69
45·0	2·30	7	2·84	3	3·40	9	4·02	5	4·70
1	2·31	8	2·86	4	3·41	59·0	4·03	6	4·71
2	2·32	9	2·87	5	3·43	1	4·04	7	4·73
3	2·33	50·0	2·88	6	3·45	2	4·06	8	4·75
4	2·34	1	2·90	7	3·46	3	4·07	9	4·77
5	2·35	2	2·91	8	3·47	4	4·09	64·0	4·79
6	2·36	3	2·92	9	3·48	5	4·11	1	4·80
7	2·37	4	2·93	55·0	3·49	6	4·12	2	4·82
8	2·38	5	2·94	1	3·51	7	4·14	3	4·84
9	2·39	6	2·96	2	3·52	8	4·15	4	4·85
46·0	2·40	7	2·97	3	3·53	9	4·16	5	4·87
1	2·42	8	2·98	4	3·55	60·0	4·18	6	4·88
2	2·43	9	2·99	5	3·56	1	4·19	7	4·90
3	2·44	51·0	3·00	6	3·57	2	4·20	8	4·92
4	2·45	1	3·01	7	3·59	3	4·21	9	4·93
5	2·46	2	3·03	8	3·60	4	4·23	65·0	4·95
6	2·47	3	3·04	9	3·61	5	4·24	1	4·97
7	2·49	4	3·05	56·0	3·63	6	4·26	2	4·98
8	2·50	5	3·06	1	3·64	7	4·27	3	5·00
9	2·51	6	3·08	2	3·65	8	4·29	4	5·02
47·0	2·52	7	3·09	3	3·67	9	4·30	5	5·04
1	2·54	8	3·10	4	3·68	61·0	4·32	6	5·05
2	2·55	9	3·11	5	3·69	1	4·33	7	5·07
3	2·56	52·0	3·12	6	3·71	2	4·35	8	5·09
4	2·57	1	3·14	7	3·72	3	4·36	9	5·11
5	2·58	2	3·15	8	3·73	4	4·37	66·0	5·12
6	2·60								

200 *cm*³ Milch werden in einer Schüttelflasche mit 10 *cm*³ Kalilauge vom spezifischen Gewicht 1·27 und mit 60 *cm*³ Äther gut verschlossen und kurze Zeit durchgeschüttelt. Dann wird die Flasche durch Hineinstellen in ein großes Gefäß mit Wasser von 17·5° auf diese Temperatur gebracht und in kurzen Abständen 1/4 Stunde lang, am besten in senkrechter Richtung

durchgeschüttelt. Nach etwa 15 Minuten scheidet sich eine klare Ätherfettschicht ab. Die Flasche mit der Fettlösung wird nun mittelst eines Schlauches mit dem Rohr verbunden, in dem sich das Aräometer befindet. Das Rohr wird durch einen äußeren Mantel mit Wasser von 17·5° gekühlt. Mittelst eines Gummiballes drückt man die Ätherfettlösung in das Rohr hinein und schließt das letztere von unten mit einer Klemmschraube zu. Man wartet einige Minuten, damit sich die Temperatur ausgleicht und liest dann den Berührungspunkt der Skala des in der Fettschicht schwimmenden Aräometers mit dem unteren Meniskus der Ätherschicht ab. Aus der von *Soxhlet* empirisch aufgestellten Tabelle ermittelt man den Fettgehalt in Prozenten.

Lezithin.

Das in der Milch bzw. im Milchfett enthaltene Phosphatid hat zuerst *Rosengren* [1]) isoliert, und zwar indem er die bei der *Gottlieb-Röse*schen Methode erhaltene Ätherfettlösung mit wasserfreiem Äther nochmals extrahierte. Dabei gewann er einen unlöslichen Rückstand, der beim Verseifen mit Barytwasser eine Substanz lieferte, die aus Fettsäuren und aus Phosphorsäure bestand.

Burow [2]) hatte das Lezithin derart bestimmt, daß er in eine angesäuerte Alkoholäthermischung (100 Äther und 100 Alkohol) Milch hineintropfen ließ, nach 24 Stunden filtrierte und das Filtrat eindampfte. Der Rückstand wurde mit Äther ausgezogen, der Äther verdampft und in diesem Rückstand Phosphor bestimmt.

Glikin [3]) bestimmt quantitativ das Lezithin in der Milch, indem er eine bestimmte Menge Milch bis zur Trockne eindampft. Die Trockensubstanz wird 1—2 Stunden im Trockenofen getrocknet, dann im Mörser fein zerrieben und in eine Patrone gebracht. Man zieht sie zunächst 4 Stunden mit absolutem Alkohol und dann bis zur Erschöpfung mit Chloroform aus. Die gesammelten Ätherchloroformauszüge werden verdampft und der Rückstand wird in absolutem Äther aufgenommen. Man rührt gut durch, filtriert, befreit vom Äther und nimmt einen bestimmten Teil vom getrockneten Rückstand ab, in welchem man Phosphor nach *Neumann* bestimmt. Die erhaltene Menge P_2O_5 multipliziert mit 11·3666 gibt den Gehalt an Lezithin an.

Das Ausziehen mit Alkohol bietet insofern Schwierigkeiten, als man über einem Wasser oder Dampfbad den Alkohol kaum zu einem permanenten Sieden bringen kann. Verfasser hat sich bei Lezithinbestimmungen im Laboratorium des Kaiserin Auguste Viktoria-Hauses mit gutem Erfolge der Doppelflasche nach *Zelmanowitz* [4]) (Fig. 117) als Alkohol-Aufnahmekolben bedient.

[1]) *Rosengren*, Beitrag zur Frage „*Gottlieb*“ oder „*Adams*“. Milchzeitung. 22. 1904.

[2]) *Burow*, Der Lezithingehalt der Milch und seine Abhängigkeit vom relativen Hirngewichte des Säuglings. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 30. 495. 1900.

[3]) *Glikin*, Zur biologischen Bedeutung des Lezithins; Über den Lezithin- und Eisengehalt in der Kuh- und Frauenmilch. Biochem. Zeitschr. 21. 348. 1909.

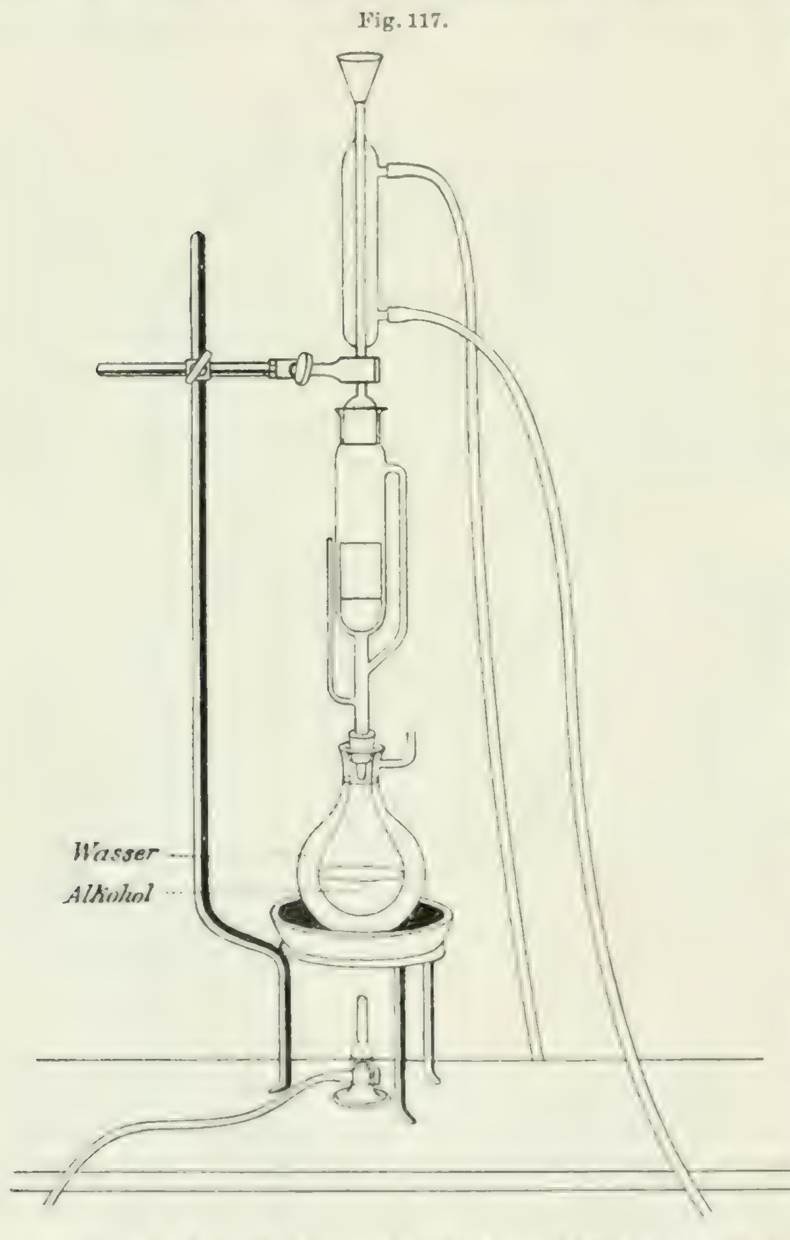
[4]) Zu haben bei den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf, Berlin.

Dieser Kolben hat den Vorzug, daß man ein konstantes Sieden des Alkohols erzielt, ohne letzteren direkt mit einer Flamme erhitzen zu müssen, was bei einer längeren Behandlung mit Alkohol immer gefährlich ist. Der äußere Raum der Flasche ist mit Wasser gefüllt, welches, zum Kochen erhitzt, den Alkohol zum Sieden bringt.

Methode nach *Nerking* und *Haensel.*[1])

100 cm^3 Milch werden unter Umrühren mit 200 cm^3 Alkohol gefällt und der gut abgesetzte Niederschlag filtriert. Nun wird einerseits der Niederschlag mit dem Filter 30 Stunden lang in einer Soxhlethülse mit Chloroform extrahiert, andrerseits das alkoholische Filtrat bei geringer Temperatur (50—60°) eingedampft und der Rückstand bis zur Erschöpfung mit Chloroform ausgezogen. Beide Extrakte werden vereinigt, durch Verdampfen Alkohol und Chloroform verjagt, der Rückstand mit Salpetermischung verascht und darin die Phosphorsäure zunächst als Ammoniummolybdenphosphat gefällt. Dieses wird in Ammoniak gelöst, die Phosphorsäure als Magnesiumammoniumphosphat gefällt und als Pyrophosphat gewogen. Die Menge $Mg_2P_2O_7$ mit 7·27 multipliziert gibt den Gehalt an Lezithin an.

Fig. 117.



Nach dieser Methode fanden *Nerking* und *Haensel* in der Frauenmilch im Mittel 0·0499%, in der Kuhmilch im Mittel 0·0629% Lezithin.

Alle diese Verfahren können keinen Anspruch auf Genauigkeit erheben. Die Isolierung der Phosphatide weist überhaupt noch große Mängel

[1]) *Nerking* und *Haensel*, Der Lezithingehalt der Milch. Biochem. Zeitschr. XIII. 348. 1908.

auf, weil dieselben infolge ihrer leichten Zersetzlichkeit verschiedenen Veränderungen unterworfen sind, über deren Natur man noch keine genügende Kenntnis besitzt.[1])

Cholesterin.

Cholesterin, ein höherer Alkohol (nach *Windaus*[2]) ein sekundärer, ungesättigter Alkohol), ist in sehr geringer Menge in der Kuhmilch, auch in der Frauenmilch vorhanden. In welcher Form Cholesterin in der Milch vorkommt, ob frei oder als Ester, darüber ist noch nichts Sicheres bekannt.

Eiweißstoffe der Milch.[3])

(Kasein, Albumin, Globulin.)

Das Kasein (der Käsestoff) ist in der Milch in gequollenem Zustande suspendiert und zwar als eine Kaseinkalziumverbindung.

Kreidl und *Neumann*[4]) haben die Milch verschiedener Tiere ultramikroskopisch untersucht[5]) und im Milchplasma außer Fettröpfchen noch eine große Anzahl anderer in lebhafter Bewegung sich befindender Teilchen beobachtet. Diese Teilchen halten sie für Kasein. Sie haben nämlich Lösungen von nach *Hammarsten* dargestelltem Kasein mit dem Milchplasma verglichen, wobei sie feststellten, daß beide (Milchplasma und Kaseinlösung) durch das Ultramikroskop gleich aussehen. Anders sieht das Milchplasma der Frauenmilch, durch das Ultramikroskop betrachtet, aus. Man sieht nur Fettkügelchen, das übrige Plasma erscheint schwarz. Diese Untersuchungen erklären vielleicht die schwere Fällbarkeit des Frauenmilchkaseins.

Das Kasein der Kuhmilch stellt man am besten nach der Methode von *Hammarsten*[6]) dar.

Man verdünnt die Milch mit 4 Teilen Wasser und versetzt diese Mischung mit soviel Essigsäure, daß etwa 0·7—1 *g* pro 1000 Flüssigkeit enthalten ist.

Das Kasein scheidet sich in dicken Flocken ab; es wird filtriert und mit Wasser gewaschen. Das bei der Fällung mitgerissene Fett wird durch Behandlung mit Alkohol und nachträglich durch Extrahieren mit Äther entfernt.[7]) Das entfettete Kasein wird in sehr verdünntem Alkali gelöst, und zwar wird es zunächst in einer Reibschale mit 250 cm^3 Wasser über-

---

[1]) Siehe auch *Schultze* und *Winterstein*, Phosphatide. Bd. 2 dieses Handbuches. S. 256.

[2]) *Windaus*, Über Cholesterin. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 41. 611 und 2558. 1908.

[3]) Siehe auch *Fr. Samuely*, Gruppe der nicht kristallisierbaren Proteine. III. Die Eiweißkörper der Milch. Bd. 2 dieses Handbuches. 383.

[4]) *Kreidl* und *Neumann*, Ultramikroskopische Betrachtungen über das Verhalten der Kaseinsuspension in der frischen Milch und bei der Gerinnung. *Pflügers* Archiv, Bd. 123. 523. 1908.

[5]) Siehe *Schulz*, Ultramikroskop. Bd. 1. 283 dieses Handbuches.

[6]) *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chemie. 618. 1910.

[7]) Diese Entfettung muß sehr gründlich sein und dauert sehr lange.

gossen und dann unter starkem Rühren allmählich Natronlauge (1 : 10) zugetropft. Jetzt filtriert man, fällt wieder mit Essigsäure und wäscht gründlich mit Wasser aus.

Diese Umfällung nimmt man einige Male vor und trocknet dann das Kasein, am besten im Vakuumexsikkator über Schwefelsäure oder bei 60—70°.

Die durch Lab entstandene Fällung, das Parakasein[1]), ist wie das Kasein in Alkalien löslich.

Das Parakasein enthält Kalk und zu seiner Fällung mit Lab ist die Gegenwart von Kalksalzen notwendig. Man kann dies sehr leicht beweisen, wenn man zu 100 cm^3 Milch, der man 5 cm^3 einer 1%igen Natriumoxalatlösung zugesetzt hat, Lablösung zugibt und auf 40° erwärmt. Es erfolgt keine Gerinnung, weil das zur Ausfällung notwendige Kalzium an Oxalsäure gebunden ist.

Erst auf Zusatz von wenig Chlorkalzium erfolgt die Gerinnung.[2])

Man kann das Kasein aus der Milch auch mit einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung ausscheiden[3]), und zwar in einer in Wasser oder verdünnter Salzlösung löslichen Form.

Man sättigt 100 cm^3 Milch mit Magnesiumsulfat durch Schütteln mit dem gepulverten Salz. Nun filtriert man durch ein Filter, das mit gesättigtem Magnesiumsulfat befeuchtet ist und wäscht mit Magnesiumsulfatlösung nach. Der Niederschlag, ein Gemenge von Kasein und Fett und etwas Globulin (Albumin wird nicht mitgefällt), wird durch Verrühren mit Wasser gelöst. Die Lösung läßt man einige Zeit stehen, wobei sich das Fett oben absetzt. Filtriert man nun von dem Fett ab und gibt Essigsäure zu, so fällt das Kasein aus.

Ganz anders verhält sich die Frauenmilch in bezug auf die Kaseinfällung. Auf Zusatz von Essigsäure fällt meistens kein Kasein aus; man muß die Milch entsprechend vorbehandeln.

Fuld und *Wohlgemuth*[4]) bedienen sich des Gefrierens, tauen nachträglich die Milch auf und fällen direkt mit Säure.

Wroblewski[5]) gibt folgende Methode an:

Man fällt in der Frauenmilch mittelst Ammoniumsulfat ein Gemenge von Kasein und Albumin und filtriert ab. Der Niederschlag wird mit 30%iger Ammoniumsulfatlösung gewaschen und mit Wasser verrieben, wobei alles in Lösung geht.

Durch Dialysieren wird die Lösung vom Salz befreit, das Fett wird mit Äther entfernt und das Kasein mit $\frac{n}{10}$ Essigsäure gefällt. Das Ver-

[1]) Siehe *Fr. Samuely*, Bd. 2 der Arbeitsmethoden. 387.

[2]) *E. Salkowski*, Praktikum d. physiol. u. pathol. Chemie. S. 93. 1906.

[3]) *E. Salkowski*, Praktikum der physiol. u. pathol. Chemie. 91. 1906.

[4]) l. c.

[5]) *Wroblewski*, Beiträge zur Kenntnis des Frauenkaseins und seine Unterschiede vom Kuhkasein. Dissertation. Bern 1894.

fahren hat eigentlich nur historisches Interesse und liefert kein ganz reines Präparat.

Viel besser ist die Methode von *Kobrak*[1]), nach der man die Milch zuerst durch Zentrifugieren vom Fett befreit, die Magermilch mit $^1/_5$ des Gesamtvolumens $\frac{n}{10}$ Essigsäure versetzt und 5 Tage lang gegen Chloroform dialysiert. Das in feinen Flocken sich dabei ausscheidende Kasein wird abfiltriert und in Alkohol und Äther gewaschen.

Die Dialyse führt man am besten in abgesprengten, mit Pergamentpapier umwundenen Bechergläsern aus und stellt sie in ein mit Chloroformwasser gefülltes Gefäß ein.

Ein sehr reines Frauenmilchkasein liefert das Verfahren nach *Engel*.[2])

1 *l* Milch wird mit 700 cm^3 $\frac{n}{10}$ Essigsäure verdünnt und in einer großen Flasche auf 5000 mit Wasser aufgefüllt, geschüttelt und im Eisschrank 2—3 Stunden stehen gelassen. Dann wird der ganze Inhalt in ein großes Gefäß gegossen und in ein Wasserbad von 40—45° hineingestellt. Nach $^1/_4$ Stunde, nachdem das Gemisch die Temperatur von 30° angenommen hat, filtriert man durch ein doppeltes Filter.

Das Kasein, welches durch Albumin, Fett und etwas Milchzucker verunreinigt ist, wird vom Filter in eine Soxhlethülse abgeschabt und darin durch Extraktion mit Äther vom Fett befreit. Das Rohprodukt wird in einer Kugelmühle fein gepulvert und dann in einer großen Zentrifuge nacheinander mit schwach essigsaurem Wasser, Alkohol und Äther so lange gewaschen, bis das Kasein frei von Milchzucker und beigemengtem Eiweiß ist. Das schön weiße, an der Luft zerbröckelnde Pulver wird über H_2SO_4 im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute am Reinprodukt beträgt etwa 0·2%.

Eine bessere Ausbeute liefert das Verfahren nach *Langstein-Edelstein*.[3])

Frische Frauenmilch wird 1 Stunde lang zentrifugiert (3000 Touren-Zentrifuge), das angesetzte Fett abgeschöpft und die Magermilch mit $^1/_5$ des Gesamtvolumens $\frac{n}{10}$ Essigsäure unter Umrühren versetzt. In wenigen Minuten setzt sich das grobflockig ausfallende Kasein zu Boden. Man gießt von der trüben, darüber stehenden Flüssigkeit ab und wäscht das Kasein durch inniges Umrühren und Zentrifugieren mit Wasser, Alkohol und Äther. Es muß immer je eine halbe Stunde lang zentrifugiert werden.

Nachdem das Kasein im Soxhletapparat völlig vom Fett befreit ist, wird es fein gepulvert und in vacuo über Schwefelsäure getrocknet. Die Ausbeute beträgt zirka 0·4%.

---

[1]) *Kobrak*, Beiträge zur Kenntnis des Kaseins der Frauenmilch. *Pflügers* Archiv. Bd. **80**. 1900.

[2]) *Engel*, Eine einfache Methode zur quantitativen Abscheidung des Kaseins aus gemeiner Frauenmilch. Biochem. Zeitschr. 13 und Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der Frauenmilch zu Säure und Lab. Ibid. 14. 234. 89. 1908.

[3]) *Langstein-Edelstein*, Über die Einheitlichkeit des Frauenmilchkaseins. Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 72. Ergänzungsheft 1. 1910.

Es kommt allerdings vor, daß ab und zu die Fällung nicht gelingt. Eine Erklärung dafür wurde bis jetzt noch nicht gefunden.

Als Kriterium der Reinheit des Kaseins, sowohl des Kuhmilch- als des Frauenmilchkaseins gilt folgendes:

Das Präparat darf keine positive *Molisch*sche Reaktion [1]) geben, höchstens eine ganz minimale Andeutung einer violetten Färbung, ferner keine Reaktion auf Zucker oder Eiweiß und muß fast aschefrei sein.

Das letztere gilt besonders für das Kuhmilchkasein.

Albumin.

Zur Darstellung des Albumins [2]) wird das Filtrat des Kaseinniederschlags, welches Albumin, Milchzucker und Salze enthält, filtriert und am besten in einem emaillierten Eisengefäß auf die Hälfte eingedampft. Das Albumin scheidet sich in groben Flocken aus. Es wird abfiltriert, mit heißem Wasser ausgewaschen und getrocknet.

Globulin.

Laktoglobulin stellt man nach *Sebelien* [3]) dar, indem man Milch mit Kochsalz sättigt, den Niederschlag abfiltriert, das Filtrat auf 35° erwärmt, von dem restlichen Kasein abfiltriert und nun die Lösung mit Magnesiumsulfat fällt. Dieser Niederschlag wird abfiltriert, in Wasser gelöst, wieder mit Magnesiumsulfat gefällt, nochmals gelöst, mit Chlornatrium gefällt und dialysiert. Dabei scheiden sich Flocken aus, die man in 10%iger Kochsalzlösung löst und auf 75° erwärmt. Hierbei erfolgt eine Gerinnung.

Sehr oft scheidet sich das Globulin bei der Dialyse nicht aus. Man fällt dann am besten mit Alkohol und trocknet das gefällte Globulin mit Alkohol und Äther.

Bestimmung des Stickstoffes in der Milch.

5 oder 10 cm^3 Milch werden in einem Kjeldahlkolben mit 10 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und 0·4 *g* gelbem Quecksilberoxyd versetzt und über einer Flamme so lange erhitzt, bis eine klare, farblose Flüssigkeit zurückbleibt. Man muß darauf achten, daß die Flüssigkeit nicht fast zur Trockne eindampft, weil die Stickstoffbestimmung dann Fehler aufweist.

[1]) Die *Molisch*sche Reaktion führt man so aus, daß man ganz wenig Kasein in $\frac{n}{10}$ Natronlauge sorgfältig löst, zu dieser Lösung 1—2 Tropfen einer 10%igen alkoholischen α-Naphthallösung zugibt und mit 1 cm^3 reiner konzentrierter Schwefelsäure überschichtet (violetter Ring). Um auf Eiweiß oder Zucker zu prüfen, schüttelt man etwas Kasein kurze Zeit mit Wasser und filtriert ab. Dieses Filtrat verwendet man für die Reaktionen. Eiweiß: Trübung auf Zusatz von mit Salzsäure angesäuerter Phosphorwolframsäurelösung. Milchzucker: Reduktion der *Fehling*schen Lösung.

[2]) *E. Salkowski*, Praktikum d. physiol. u. patholog. Chemie. 82. 1906.

[3]) *Sebelien*, Beitrag zur Kenntnis der Eiweißkörper der Kuhmilch. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. 9. 445. 1885.

Nun wird nach dem Erkalten und Verdünnen mit 3 Teilen destillierten Wassers die übliche Destillation nach *Kjeldahl* und zwar in demselben Kolben ausgeführt, unter Zugabe von etwas Talkum (um das Stoßen zu verhindern), von 10 cm^3 einer 20%igen Natriumthiosulfatlösung und schließlich von konzentrierter 33%iger Kalilauge bis zur stark alkalischen Reaktion.

Als Vorlage bedient man sich einer $\frac{n}{10}$ oder $\frac{n}{5}$ Schwefelsäure.[1]

Aus dem Gesamtstickstoff der Milch kann man durch Multiplikation mit einem entsprechenden Faktor den Eiweißgehalt der Milch berechnen.[2]

Da die Milch außer den Eiweißstoffen noch andere, wenn auch geringe Mengen stickstoffhaltiger Substanzen (Harnstoffderivate) u. a., z. B. Lezithin enthält, einen sogenannten Reststickstoff, so ist die Eiweißbestimmung, aus Stickstoff berechnet, nicht ganz genau und gibt etwas zu hohe Werte. Besonders gilt dies für Frauenmilch, für die *Rietschel*[3]) einen Gehalt von 15—20% Reststickstoff, *Cammerer* und *Söldner*[4]) einen etwas niedrigeren Durchschnittsgehalt gefunden hat.

Man kann das Gesamteiweiß der Milch auch direkt bestimmen, und zwar nach folgenden Methoden:

Gesamteiweißbestimmung in der Milch.

Nach *Ritthausen*.[5])

25 *g* Milch werden in einen 500 cm^3-Meßkolben hineingefüllt und mit 400 cm^3 destilliertem Wasser verdünnt. Dann werden 10 cm^3 Kupfersulfatlösung (*Fehling*sche Lösung I) und 3—4 cm^3 einer Normalkalilauge zugesetzt und bis auf die Marke mit Wasser aufgefüllt. Man schüttelt um und filtriert das ausgefällte Eiweiß durch ein trockenes Filter, dessen Stickstoffgehalt bekannt ist. Das Filtrat muß fast neutral oder höchstens schwach sauer sein und ein Tropfen davon darf auf Zusatz von Natron-

[1]) *Rona*, Bestimmung des Stickstoffes nach *Kjeldahl*. Bd. 1. 340 dieses Handbuches.

[2]) Das Kasein enthält 15·65% Stickstoff, das Milchalbumin 15·77% N (Globulin kann wegen der geringen Menge vernachlässigt werden). Daraus ergibt sich der Faktor für Gesamteiweiß 6·37. (*Hammarsten*, Zur Frage, ob das Kasein ein einheitlicher Stoff ist. Zeitschr. f. physiol. Chemie. VII. 269. 1883.) *Stohmann* und *Langbein* (Kalorimetrische Untersuchungen über den Wärmewert der Nahrungsbestandteile und deren Derivate. N. F. Journ. f. prakt. Chemie. 44. 349. 1891) berechneten den Faktor für Gesamteiweiß zu 6·25, und zwar aus dem Stickstoffgehalt des Milcheiweißes, den sie auf kalorimetrischem Wege berechnet hatten (16% N).

[3]) *Rietschel*, Über den Reststickstoff der Frauenmilch. Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 64. S. 125. 1906.

[4]) *Cammerer* und *Söldner*, Analyse der Frauenmilch, Kuhmilch und Stutenmilch. Zeitschr. f. Biologie. Bd. 33. S. 535. Die Bestandteile der Frauen- und Kuhmilch. Ibid. 36. 278. 1898.

[5]) *Ritthausen*, Neue Methode zur Analyse der Milch und über ein vom Milchzucker verschiedenes Kohlehydrat in der Kuhmilch. Journ. f. prakt. Chemie. N. F. 15. 329. 1877.

lange weder eine Blaufärbung (gelöstes Kupfer) noch eine Trübung (Eiweiß) geben.

Man wäscht den Niederschlag einigemal mit kaltem Wasser nach und bestimmt im Niederschlag den Stickstoff nach *Kjeldahl*. Die Stickstoffzahl mit 6·37 multipliziert gibt die in 5 *cm*³ Milch enthaltene Eiweißmenge an.[1])

Nach *Liebermann*[2]) (*Sebelien*).[3])

Während die *Ritthausen*sche Methode auf der Fällbarkeit der Eiweißstoffe durch Kupfersalze bzw. Kupferoxyd beruht, wird bei dieser Methode zur Ausfällung der Eiweißstoffe Gerbsäure benutzt. Man muß die Fällung in einer stark salzhaltigen Lösung vornehmen, weil nur in einer solchen das Eiweiß quantitativ ausfällt.

20 *g* Milch werden mit 40 *cm*³ Wasser verdünnt, dazu werden 5 *cm*³ einer 18%igen Kochsalzlösung gegeben und so lange mit einer Gerbsäurelösung (hergestellt durch Mischen von 20 *g* Tannin, 40 *cm*³ 25%iger Essigsäure, 400 *cm*³ absoluter Alkohol und Auffüllen auf 1 *l*) versetzt, bis kein merkbarer Niederschlag mehr ausfällt (20—30 *cm*³ Gerbsäurelösung). Der Eiweißniederschlag wird filtriert, mit Wasser nachgewaschen und der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt.

Kaseinbestimmung.

Will man Kasein in der Milch bestimmen, so muß man es als solches ausfällen, den Stickstoff bestimmen und daraus das Kasein durch Multiplikation mit 6·39 berechnen. Fast sämtliche Kaseinbestimmungsmethoden beruhen auf diesem Prinzip.

Methode nach *Hoppe-Seyler*.[4])

20 *cm*³ Milch werden mit Wasser auf 400 *cm*³ verdünnt und unter Umrühren so lange mit einer sehr verdünnten Essigsäure versetzt, bis ein flockiger Niederschlag entsteht; nun leitet man eine ½ Stunde lang Kohlensäure durch und läßt 12 Stunden bis zum Absetzen stehen. Es kommt sehr oft vor, daß die über dem Kaseinniederschlag stehende Flüssigkeit nicht ganz klar ist. Dann muß man diese Prozedur mit einer anderen Portion wiederholen. Ist nach dem Ausfällen und Kohlensäureeinleiten und nach dem 12stündigen Stehenlassen die Flüssigkeit klar, so wird das Ganze

[1]) Es ist nicht ganz leicht, den Eiweißniederschlag und Filter in den Kjeldahlkolben zwecks Oxydation hineinzubringen. Die Oxydation dauert ziemlich lange. Oft wird man die an den Wänden sich absetzende Kohle mit etwas Wasser herunterspülen, oft auch erneut Schwefelsäure zugeben müssen.

[2]) *Liebermann*, Über den Stickstoff- und Eiweißgehalt der Frauenmilch und der Kuhmilch. Ann. Chem. 181. 90. 1876.

[3]) *Sebelien*, Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweißkörper mit besonderer Rücksicht auf die Milch. Zeitschr. f. phys. Chemie. 13. 144. 1889.

[4]) *Hoppe-Seyler*, Handbuch der physiol. u. pathol.-chem. Analyse. 1909. S. 723.

auf ein gewogenes Filter filtriert und einmal mit Wasser nachgewaschen. (Etwas Kasein geht dabei in Lösung.) Hierauf wird der Niederschlag mit gewöhnlichem, dann mit absolutem Alkohol und Äther ausgewaschen, bei 125° das Filter samt Kasein getrocknet, gewogen und im Platintiegel vollkommen verbrannt und die Asche gewogen; die Differenz gibt die Menge des Kaseins an. Statt das Kasein zur Wägung zu bringen, kann man auch im Niederschlag (nicht entfettet!) N bestimmen und durch Multiplikation mit 6·37 das Kasein berechnen. Diese Bestimmung kann für alle Milcharten verwendet werden, nur für die Frauenmilch gibt sie keine richtigen Resultate.

Für die Kaseinbestimmung in der letzteren kann man sich mit Vorteil der Methode von *Engel* bedienen. Nach dieser gibt man zu 50 *cm*³ Frauenmilch 30—35 *cm*³ $\frac{n}{10}$ Essigsäure hinzu, verdünnt auf 250 *cm*³, schüttelt gut um und läßt 2 Stunden bei einer Temperatur von 0° stehen. Dann wird das Ganze in ein Wasserbad von 40° gebracht, ½ Stunde lang erwärmt und filtriert und vom Niederschlag der Stickstoff bestimmt. Ebenso ist für Kasein der Frauenmilch, wie auch übrigens der Kuhmilch, die Methode von *Schmidt*[1]) anwendbar. Sie besteht in einer Modifikation der *Hoppe-Seyler*schen Methode, und zwar darin, daß man 20 *cm*³ Milch 10fach mit Wasser verdünnt und mit einer 0·4%igen Essigsäure so lange versetzt, bis ein körnig-flockiger Niederschlag entsteht. Es wird dann unter Erwärmen eine ½ Stunde lang Kohlensäure eingeleitet und der Kaseinniederschlag nach 24 Stunden filtriert. Der Niederschlag samt dem Filter wird wie bei *Hoppe-Seyler* getrocknet, gewogen und verascht.

Methode nach *Sebelien*.[2])

Sie beruht darauf, daß man das Kasein mit einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung ausfällt und wird wie folgt ausgeführt.

Eine Mischung von 20 *g* Milch mit 80 *cm*³ einer gesättigten Magnesiumsulfatlösung wird mit gepulvertem Magnesium vollkommen gesättigt. Der Niederschlag wird filtriert und 6—8mal mit gesättigter Lösung von Magnesiumsulfat gewaschen. Mit dem Kasein fällt hier auch das Globulin aus. Im Niederschlage wird der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt und durch Multiplikation mit 6·37 Kasein + Globulin berechnet.

Schlossmann[3]) fällt das Kasein mit gesättigtem Kalialaun aus. 10 *cm*³ Milch mit 3—5 Teilen Wasser verdünnt, werden in ein Wasserbad von genau 40° gebracht und mit 1 *cm*³ gesättigter Kalialaunlösung versetzt. Man rührt

[1]) Siehe bei *Dogiel*, Einiges über die Eiweißkörper der Frauenmilch und Kuhmilch. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 9. 591. 1885; *Schmidt*, Materialien zur Erklärung der Eigenschaften der Frauenmilch und Kuhmilch. Dissertation. Moskau 1882, zitiert nach *Dogiel*; siehe auch Handbuch von *Hoppe-Seyler*, 1909. S. 725.

[2]) *Hoppe-Seyler*, Handbuch d. physiol. u. pathol.-chem. Analyse. 726. 1909.

[3]) *Schlossmann*, Über die Eiweißstoffe der Milch und die Methoden ihrer Trennung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 22. 197. 1896—97.

um und wartet, bis das abgeschiedene Kasein sich absetzt. Sonst gibt man noch 0·5 *cm*³ der Lösung tropfenweise hinzu. Man filtriert den Niederschlag, wäscht ihn gut mit Wasser aus und bestimmt in ihm, noch feucht, den Stickstoff nach *Kjeldahl*.

Eines vollkommen anderen Prinzipes bedient sich neuerdings *Matthaiopulos* [1]), und zwar bestimmt er das Kasein durch Titration. Das Prinzip ist wie folgt: Auf Zusatz von verdünnter Säure zur Milch fällt das Kasein aus, das Albumin dagegen bleibt als Säureverbindung gelöst. Wir wissen ferner, daß das Kasein sich dem Phenolphtalein gegenüber wie eine Säure verhält und mit Alkali in Wasser lösliche Salze bildet. Titriert man nun einerseits gegen Phenolphtalein als Indikator das ausgefällte Kasein + Flüssigkeit mit Natronlauge, so wird sowohl das Kasein wie alle anderen sauren Verbindungen neutralisiert, und es wird eine bestimmte Menge Natronlauge verbraucht. Titriert man aber andrerseits nur die vom Kasein abfiltrierte Flüssigkeit, so werden nur die anderen sauer reagierenden Körper neutralisiert. Die Differenz der beiden Titrationen ergibt die für Kasein verbrauchte Menge Natronlauge. Weiß man nun, wieviel Gramm Kasein 1 *cm*³ Natronlauge entspricht oder kennt man — mit anderen Worten — das Äquivalentgewicht des Kaseins, so kann man daraus das letztere berechnen. Das Äquivalentgewicht des Kaseins wird von *Matthaiopulos* aus dem Vergleich seiner Bestimmung und der nach *Hoppe-Seyler* zu 0·11315 angenommen.

20 *cm*³ Milch verdünnt man mit 80 *cm*³ Wasser und läßt dazu aus einer Bürette so viel $\frac{n}{25}$ Schwefelsäurelöung unter Umrühren zutropfen, bis das Kasein in großen Flocken ausfällt. Nach kurzer Zeit filtriert man durch ein trockenes Filter. Ist das Filtrat trübe, so gießt man es noch einmal aufs Filter und dies wiederholt man so lange, bis das Filtrat vollkommen klar ist. Ist auf diese Weise ein klares Filtrat nicht zu erreichen, so ist noch nicht alles Kasein ausgefällt, und man muß noch einige Zehntel Schwefelsäure aus der Bürette zusetzen. Von dem klaren Filtrat werden 100 *cm*³ mit 1 *cm*³ Phenolphtalein versetzt und mit $\frac{n}{10}$ Natronlauge bis auf schwach rot titriert.

Andrerseits setzt man zu einem Gemisch von 20 *cm*³ Milch + 80 Wasser genau so viel $\frac{n}{25}$ Schwefelsäure zu, als man zur ersten Portion zugegeben hat. Nun wird nicht filtriert, sondern die Mischung Kasein + Flüssigkeit direkt nach Zugabe von 1 *cm*³ Phenolphtalein mit $\frac{n}{10}$ Na OH bis auf schwach rot titriert. Man berechnet die Zahl der verbrauchten Kubikzentimeter Normallauge bei der filtrierten Portion auf die ganze Menge (also unter Berücksichtigung der zugesetzten Säure) aus der Formel

[1]) *Matthaiopulos*, Feststellung des Äquivalentgewichtes des Kaseins und eine neue Methode zur Bestimmung desselben. Zeitschr. f. analyt. Chemie. 47. 492. 1908.

$\frac{t(100 + a)}{100}$, wo t die verbrauchten Kubikzentimeter Lauge und a die zugesetzte Menge Säure bedeutet, zieht diese ungerechneten Kubikzentimeter von den bei der zweiten Titration (ohne Filtrieren) verbrauchten Kubikzentimetern $\frac{n}{10}$ Lauge ab und multipliziert diese Differenz mit 0·11315. Das Resultat ist die in 20 cm^3 Milch enthaltene Kaseinmenge.

Nach *Burr* und *Berberich* [1]) soll man den Kaseinniederschlag mindestens 3mal mit heißem destillierten Wasser waschen und Filtrat und Waschwasser gemeinsam titrieren.

Die Methode von *Matthaiopulos* ist sehr bequem auszuführen, erfordert wenig Zeit und gibt recht gute Werte. Ob sie auch für Frauenmilch zulässig ist, ist noch nicht nachgeprüft worden.

Nach *Lehmann*. [2])

Diese Methode wird seltener angewandt, liefert aber recht brauchbare Resultate, besonders, wenn man sich in die einzelnen Manipulationen, die sehr sorgfältig ausgeführt werden müssen, eingeübt hat. Die Methode beruht darauf, daß das in der Milch befindliche suspendierte Kasein von den anderen Milchbestandteilen durch einen porösen Tonteller mechanisch getrennt wird.

Man bereitet sich zunächst die zu untersuchende Milch vor, indem man eine bestimmte Menge Milch mit gleichen Teilen Wasser verdünnt und gut durchmischt. 10 cm^3 dieser Mischung werden nun zur Analyse gebraucht. Der Apparat, mittelst dessen die Trennung durchgeführt wird, besteht aus einem Tonteller, der auf seiner oberen Fläche schwach konkav und mit Achat poliert ist. Dieser Teller wird auf eine Glasschale gestellt; 10 cm^3 der Milchmischung werden vorsichtig in die Mitte des Tellers aufgetropft, so daß die Milchflüssigkeit einen Kreis bildet. Nun wird das Ganze mit einer innen etwas angefeuchteten Glasglocke bedeckt und 2—3 Stunden stehen gelassen. Das Serum und Albumin werden vom Ton aufgesaugt, und auf der Oberfläche des Tellers bleibt in Form einer dünnen Hautschicht das Kasein und Fett zurück. Man schabt mittelst eines scharfen Spatels das Häutchen vorsichtig ab und bringt es in einen Kjeldahlkolben.

Jetzt wird die Glasschale, auf der der Tonteller ruht, mit Wasser gefüllt und der Teller so aufgesetzt, daß seine untere Fläche das Wasser berührt, und läßt wieder einige Zeit stehen. Durch den Druck des Wassers von unten werden die kleinen in die obere Fläche des Tontellers eingedrungenen Kaseinreste wieder herausgepreßt; diese werden mit dem Spatel abgeschabt und der anderen Kaseinportion im Kjeldahlkolben zugegeben.

Aus der Stickstoffbestimmung berechnet man die Kaseinmenge in 5 cm^3 Milch.

[1]) *Burr* und *Berberich*, Bestimmung des Kaseingehaltes der Milch durch Titration nach dem Verfahren von *Matthaiopulos*. Hildesheimer Molkereizeitung. 52. 1453. 1909.

[2]) *Lehmann*, Über eine neue Methode der Kasein- und Fettbestimmung in der Milch. Annal. d. Chemie. 189. 358. 1877.

Albuminbestimmung.

Das Filtrat des Kaseinniederschlags (erhalten sowohl bei der Methode von *Hoppe-Seyler* als bei der nach *Schmidt* oder *Engel*) wird einige Minuten erhitzt. Das dabei auskoagulierte Albumin (mit Globulin verunreinigt) wird durch ein gewogenes Filter filtriert, mit kaltem Wasser nachgewaschen, bei 125° getrocknet und gewogen.

Milchzucker.

Dampft man das Milchserum bis zur Sirupkonsistenz ein, so scheidet sich die Laktose beim Stehenlassen durch reichliche Kristallisation aus. Zur Darstellung verwendet man die süßen Molken. Durch Erhitzen entfernt man das koagulierte Eiweiß und dampft das Filtrat bis zum Sirup ein; am besten im Vakuum. Der auskristallisierte Milchzucker wird wiederholt umkristallisiert und stellt ein reines, weißes Präparat dar. Er reduziert ebenso wie Traubenzucker eine alkalische Kupferlösung und dreht die Polarisationsebene nach rechts. Seine spezifische Drehung[1] $(\alpha)_D$ beträgt 52·35°. Im Gegensatz zu Traubenzucker wird er von reiner Hefe nicht in Gärung versetzt. Dagegen geht er durch gewisse Spaltpilze (Schizomyzeten) in Alkoholgärung über.

Die Anwesenheit anderer Kohlehydrate in der Milch und dextrinartiger Substanzen (*Ritthausen*[2]), *Béchamp*[3]) u. a.) ist nach den Untersuchungen von *Scheibe*[4]) zumindest zweifelhaft.

Milchzuckerbestimmung.

Gewichtsanalytische Methode nach *Soxhlet.*[5])

25 *g* Milch werden nach *Ritthausen* verdünnt, enteiweißt[6]) und durch ein trockenes Filter filtriert. Je 100 *cm*³ des neutralen, höchstens schwachsauren Filtrates werden für die Zuckerbestimmung verwandt. Man stellt sich eine *Fehling*sche Lösung durch Mischen von gleichen Teilen Fehling I und Fehling II her. 50 *cm*³ dieser Lösung werden in einer tiefen Porzellanschale über einem Drahtnetz bis zum Sieden erhitzt und zu dieser siedend heißen Lösung 100 *cm*³ der Milchzuckerlösung (Filtrat) aus einer Pipette eingetragen. Man erhält das Ganze 6 Minuten im Kochen, filtriert rasch durch ein vorher schon vorbereitetes und gewogenes *Allihn*sches Röhrchen

[1]) Für $C_{12} H_{22} O_{11} . H_2 O$; diese spezifische Drehung ist konstant für Lösungen bis 30% bei einer Temperatur von 20°.

[2]) *Ritthausen*, l. c.

[3]) *Béchamp* referiert in der Chem.-Ztg. 15, 126, 1891 aus der Sitzung der Société chimique de Paris.

[4]) *Scheibe*, Die Bestimmung des Milchzuckers in der Milch durch Polarisation und Reduktion. Zeitschr. f. anal. Chemie. 40. 1. 1901.

[5]) *Soxhlet*, Das Verhalten der Zuckerarten zu alkalischen Kupfer- und Quecksilberlösungen. Journ. f. prakt. Chemie. N.F. 21. 227. 1880.

[6]) Siehe Gesamteiweißbestimmung nach *Ritthausen*.

und wäscht quantitativ mit siedend heißem Wasser nach. Der eventuell an der Schale haftende rote Kupferoxydulniederschlag wird vorsichtig mit einer Gummifahne und mit heißem Wasser abgelöst. Ist das Filtrat vollkommen farblos, so wäscht man je 3mal mit Alkohol und Äther nach und das *Allihn*sche Röhrchen ist nunmehr zur Reduktion des Kupferoxyduls zu Kupfer fertig. Das *Allihn*sche Röhrchen (Fig. 118) wird mittelst eines einfach durchbohrten Gummistopfens auf eine Saugflasche aufgesetzt und zur Bestimmung auf folgender Weise präpariert:

Fig. 118.

Asbest
Glaswolle
Asbest
Glaswolle

Zunächst kommt eine Schicht ganz reiner Glaswolle, dann eine kleine Menge in Salpetersäure und Wasser gereinigten Asbests, darauf wieder ganz wenig Glaswolle und endlich eine $1^1/_2$ *cm* hohe Schicht Asbest. Das Röhrchen wird zunächst unter ganz schwachem Saugen mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser vollkommen klar ist, dann 3mal mit Alkohol und 3mal mit Äther. Darauf wird es im Luftstrom erhitzt und gewogen. Durch dieses so vorbereitete Rohr wird das Kupferoxydul filtriert. Ist der Kupferoxydulniederschlag, wie bereits erwähnt, ausgewaschen, so schreitet man zur Reduktion. Das Röhrchen wird im Wasserstoffstrom nach vollständiger Entfernung der Luft geglüht, bis sämtliches Kupferoxydul in Kupfer verwandelt ist, was ungefähr 5 Minuten in Anspruch nimmt. Man läßt im Wasserstoffstrom erkalten und wägt. Aus der durch Gewichtszunahme festgestellten Menge Kupfer wird in der nach *Soxhlet* berechneten Tabelle der entsprechende Gehalt an Milchzucker festgestellt. Das Reduktionsvermögen der Laktose dem Kupferoxyd gegenüber in alkalischer Lösung ist von der Konzentration der Milchzuckerlösung abhängig. Man muß sich deshalb genau an die angegebenen Verdünnungen und an die Zeit der Reduktion halten. Die *Fehling*sche Lösung wird so hergestellt, daß man einerseits 34·639 *g* reines Kupfersulfat in einem 500 cm^3-Meßkolben in Wasser löst und auf 500 auffüllt. Andrerseits löst man unter Erwärmen 173 *g* weinsaures Kaliumnatrium in wenig Wasser, bringt diese Lösung in einen 500 cm^3-Meßkolben, gibt 100 cm^3 Natronlauge vom spez. Gew. 1·34 zu und füllt auf 500 auf. Beide Lösungen sollen getrennt aufbewahrt und erst vor der Bestimmung gleiche Teile dovon gemischt werden.

Scheibe[1]) hat sich einer kleinen Modifikation bedient. Er enteiweißt die Milch, indem er in einem Meßkolben von 500 cm^3 25 *g* Milch mit 400 cm^3 Wasser und 3—4 cm^3 normaler Natronlauge versetzt. Dazu gibt

[1]) *Scheibe*, l. c.

Tabelle zur Ermittlung des Milchzuckergehaltes aus dem reduzierten Kupfer nach *Soxhlet*.

Kupfer	Milchzucker	Kupfer	Milchzucker	Kupfer	Milchzucker	Kupfer	Milchzucker	Kupfer	Milchzucker	Kupfer	Milchzucker
mg		*mg*		*mg*		*mg*		*mg*		*mg*	
140	101·3	184	134·7	228	167·9	272	201·9	316	236·8	360	272·1
141	102·1	185	135·4	229	168·6	273	202·7	317	237·6	361	272·9
142	102·8	186	136·2	230	169·4	274	203·5	318	238·4	362	273·8
143	103·6	187	136·9	231	170·1	275	204·3	319	239·1	363	274·6
144	104·3	188	137·7	232	170·9	276	205·1	320	239·9	364	275·5
145	105·1	189	138·5	233	171·6	277	205·9	321	240·7	365	276·3
146	105·8	190	139·2	234	172·4	278	206·7	322	241·5	366	277·2
147	106·6	191	140·0	235	173·1	279	207·5	323	242·3	367	278·0
148	107·3	192	140·8	236	173·9	280	208·3	324	243·0	368	278·9
149	108·1	193	141·5	237	174·7	281	209·1	325	243·8	369	279·7
150	108·8	194	142·3	238	175·4	282	209·9	326	244·6	370	280·5
151	109·6	195	143·1	239	176·2	283	210·7	327	245·4	371	281·4
152	110·4	196	143·8	240	176·9	284	211·5	328	246·1	372	282·3
153	111·1	197	144·6	241	177·7	285	212·3	329	246·9	373	283·1
154	111·9	198	145·4	242	178·5	286	213·1	330	247·7	374	284·0
155	112·6	199	146·2	243	179·3	287	213·9	331	248·5	375	284·8
156	113·4	200	146·9	244	180·1	288	214·7	332	249·3	376	285·7
157	114·1	201	147·7	245	180·9	289	215·5	333	250·1	377	286·5
158	114·9	202	148·4	246	181·6	290	216·3	334	250·9	378	287·4
159	115·7	203	149·2	247	182·4	291	217·1	335	251·7	379	288·2
160	116·4	204	149·9	248	183·2	292	217·9	336	252·5	380	289·1
161	117·2	205	150·7	249	184·0	293	218·7	337	253·3	381	289·9
162	117·9	206	151·4	250	184·8	294	219·5	338	254·2	382	290·8
163	118·7	207	152·2	251	185·6	295	220·3	339	255·0	383	291·6
164	119·4	208	152·9	252	186·3	296	221·2	340	255·8	384	292·5
165	120·2	209	153·7	253	187·1	297	222·0	341	256·6	385	293·3
166	120·9	210	154·4	254	187·9	298	222·8	342	257·4	386	294·2
167	121·7	211	155·2	255	188·7	299	223·6	343	258·2	387	295·1
168	122·4	212	155·9	256	189·4	300	224·4	344	259·0	388	295·9
169	123·2	213	156·7	257	190·2	301	225·2	345	259·8	389	296·8
170	123·9	214	157·4	258	191·0	302	225·9	346	260·7	390	297·7
171	124·7	215	158·2	259	191·8	303	226·7	347	261·5	391	298·6
172	125·5	216	158·9	260	192·6	304	227·5	348	262·3	392	299·4
173	126·2	217	159·7	261	193·3	305	228·3	349	263·1	393	300·3
174	127·0	218	160·4	262	194·1	306	229·0	350	263·9	394	301·1
175	127·8	219	161·2	263	194·9	307	229·8	351	264·7	395	302·0
176	128·6	220	161·9	264	195·7	308	230·6	352	265·6	396	302·0
177	129·3	221	162·7	265	196·4	309	231·4	353	266·4	397	303·7
178	130·1	222	163·4	266	197·2	310	232·1	354	267·2	398	304·6
179	130·9	223	164·2	267	198·0	311	232·9	355	268·0	399	305·4
180	131·6	224	164·9	268	198·8	312	233·7	356	268·8		
181	132·4	225	165·6	269	199·5	313	234·5	357	269·6		
182	133·1	226	166·4	270	200·3	314	235·3	358	270·4		
183	133·9	227	167·1	271	201·1	315	236·0	359	271·3		

er 20 cm^3 einer konzentrierten Fluornatriumlösung [1]), läßt eine halbe Stunde stehen, füllt auf 500 auf, schüttelt um und filtriert. 100 cm^3 dieses Filtrates werden wie oben verarbeitet.

[1]) Zur Entfernung der Kalksalze, die bei der Bestimmung störend wirken.

Statt das Kupferoxydul zu reduzieren, kann man es auch als Kupferoxyd wägen, indem man das *Allihn*sche Röhrchen unter Luftdurchleitung so lange erhitzt, bis alles rote Kupferoxydul in schwarzes Kupferoxyd verwandelt ist. Aus dem Kupferoxydul berechnet man die entsprechende Menge Kupfer.

Nach der Methode von *Vollhard*[1]) kann man die Menge des reduzierten Kupferoxyduls auch maßanalytisch ermitteln.[2])

Das Prinzip beruht darauf, daß das Kupferoxydul in Salpetersäure gelöst wird, worauf man das Kupfernitrat in Kupfersulfat überführt und mit Rhodanammonium titriert.

Man löst das Kupferoxydul mit einigen Tropfen konzentrierter Salpetersäure, versetzt diese Lösung mit 2 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure und dampft auf dem Wasserbade bis zur Trockne ein. Das als Rückstand verbleibende Kupfersulfat wird in Wasser aufgenommen, in einen 300 cm^3-Meßkolben quantitativ übergespült und mit einer Natriumkarbonatlösung so lange versetzt, bis ein Niederschlag entsteht. Durch Hinzufügen von 50 cm^3 einer kaltgesättigten schwefligsauren Lösung wird die Flüssigkeit klar. Es muß nun vorsichtig aufgekocht und so viel $\frac{n}{10}$ Rhodanammoniumlösung hinzugefügt werden, bis die blaugrüne Farbe verschwunden ist. Dann füllt man auf 300 cm^3 mit Wasser auf, schüttelt um und filtriert durch ein trockenes Filter. Das überschüssige Rhodanammonium wird mit $\frac{n}{10}$ Silberlösung unter Anwendung von Eisenammoniakalaun als Indikator zurücktitriert. Dazu werden 100 cm^3 des klaren Filtrates mit einigen Tropfen Salpetersäure angesäuert und unter Zugabe von 5 cm^3 Eisenammoniakalaun so viel Silberlösung hinzugefügt, bis die rote Farbe (Eisenrhodanid) verschwunden ist.

Rechnet man die an Silbernitrat verbrauchte Menge auf die gesamte Flüssigkeitsmenge (300) um und zieht diese Zahl von den hinzugefügten Kubikzentimetern Rhodanlösung ab, so weiß man, wie viel Rhodanlösung zur Bildung des Kupferrhodanürs verbraucht wurde.

1 cm^3 $\frac{n}{10}$ Rhodanlösung entspricht 0·0063 *g* Kupfer (1 Mol. NH_4CNS = = 1 At. Cu).

Die Umsetzung der Kupfersalze in schwefligsaurer Lösung mit Ammoniumrhodanid geschieht nach folgender Gleichung:

$$2\,CuSO_4 + 2\,NH_4CNS + SO_2 + 2\,H_2O = 2\,Cu(CNS) + (NH_4)_2SO_4 + 2\,H_2SO_4.$$

Maßanalytische Methode nach *Soxhlet*.

Sie beruht auf dem Prinzip, daß man feststellt, wieviel Kubikzentimeter *Fehling*scher Lösung durch eine bestimmte Menge Zuckerlösung verbraucht werden.

[1]) Siehe *Grube*, Zuckerbestimmung in Bd. 2 dieses Handbuches.

[2]) Als Kontrollbestimmung zu verwenden.

Zu einer bestimmten Menge Milchzuckerlösung, z. B. 5 *cm*³, gibt man so viel *Fehling*scher Lösung zu, bis nach einem 20 Minuten langen Erwärmen in einem kochenden Wasserbade die Reduktion gerade beendet ist.

Man kann auch das Verfahren so anwenden, daß man sich die Zuckerlösung in eine Bürette füllt, andrerseits eine bestimmte Menge, z. B. 20 *cm*³ *Fehling*scher Lösung, in eine tiefe Porzellanschale genau abmißt, mit 50 *cm*³ Wasser verdünnt und zum Sieden erhitzt. Dann läßt man aus der Bürette so lange die Zuckerlösung in die siedende *Fehling*sche Lösung hineintropfen, bis die blaue Farbe der Flüssigkeit verschwunden ist.

Die Erkennung dieses Punktes ist nicht ganz leicht, und um sich zu vergewissern, daß alles Kupferoxyd reduziert ist, filtriert man einen kleinen Teil ab, säuert mit etwas Salzsäure an und überzeugt sich, ob die Flüssigkeit, mit Ammoniak alkalisch gemacht, nicht blau wird.

Dieser ersten Orientierungstitration folgen natürlich weitere, bei denen man viel sicherer den Endpunkt feststellen kann.

20 *cm*³ dieser *Fehling*schen Lösung entsprechen 0·134 *g* Milchzucker.

Diese maßanalytische Bestimmung ist ziemlich umständlich und liefert nicht so genaue Resultate wie die gewichtsanalytische.

Refraktometrische Bestimmung des Milchzuckers.

Auf ähnliche Weise wie für das Fett hat sich *Wollny* auch für die Bestimmung des Milchzuckers der refraktometrischen Methode bedient, und zwar hat er aus der Ablenkung des Lichtstrahles beim Durchgang durch ein Chlorkalziumserum den Gehalt an Laktose berechnet. Als Refraktometer dient auch hier das *Zeiss*sche Milchrefraktometer. Den dem abgelesenen Refraktometergrad entsprechenden Milchzuckergehalt hat *Wollny* in einer Tabelle zusammengestellt.

Man entnimmt mit dem *Wollny*schen Milchprobegläschen (Fig. 114) 5 *cm*³ Milch, versetzt sie mit 5 Tropfen einer 4%igen Chlorkalziumlösung, verschließt das Gläschen mit einem Korkstopfen, bindet es mit einem Bindfaden fest zu und stellt es auf 10 Minuten in ein kochendes Wasserbad. Nach Abkühlen in kaltem Wasser wird das Serum mittelst eines engen Glasröhrchens derart aufgesaugt, daß man das Glasröhrchen an einem Ende mit einem Wattebäuschchen verschließt, so daß man dadurch das Serum filtrieren kann. Ein Tropfen des Serums wird auf die Prismen des Refraktometers aufgetropft und sofort bei 17·5° abgelesen.

Diese Methode ist nur für die Milchzuckerbestimmung in der Kuhmilch anwendbar; in der Milch anderer Tiere ergeben sich bei ihrer Ausführung zu große Differenzen.

Die Laktose der Frauenmilch kann man mit dieser Methode überhaupt nicht bestimmen.

Tabelle zur Berechnung des Milchzuckers bei der refraktometrischen Bestimmung.

Skalen-Teile	M.-Z. %	Skalen-Teile	M.-Z. %	Skalen-Teile	M.-Z. %	Skalen-Teile	M.-Z. %
3·1	1·75	6·1	3·31	9·1	4·84	12·1	6·35
2	1·80	2	3·36	2	4·89	2	6·40
3	1·85	3	3·42	3	4·95	3	6·46
4	1·90	4	3·47	4	5·00	4	6·51
5	1·96	5	3·52	5	5·05	5	6·56
6	2·01	6	3·57	6	5·10	6	6·61
7	2·07	7	3·62	7	5·15	7	6·66
8	2·12	8	3·67	8	5·20	8	6·71
9	2·18	9	3·72	9	5·25	9	6·76
4·0	2·23	7·0	3·77	10·0	5·30	13·0	6·81
1	2·29	1	3·82	1	5·35	1	6·86
2	2·35	2	3·87	2	5·40	2	6·91
3	2·40	3	3·93	3	5·45	3	6·97
4	2·45	4	3·98	4	5·50	4	7·02
5	2·50	5	4·03	5	5·55	5	7·07
6	2·55	6	4·08	6	5·60	6	7·12
7	2·60	7	4·13	7	5·65	7	7·17
8	2·65	8	4·18	8	5·70	8	7·22
9	2·70	9	4·23	9	5·75	9	7·27
5·0	2·75	8·0	4·28	11·0	5·80	14·0	7·33
1	2·80	1	4·33	1	5·85	1	7·38
2	2·85	2	4·38	2	5·90	2	7·43
3	2·91	3	4·44	3	5·95	3	7·48
4	2·96	4	4·49	4	6·00	4	7·53
5	3·01	5	4·54	5	6·05	5	7·58
6	3·06	6	4·59	6	6·10	6	7·63
7	3·11	7	4·64	7	6·15	7	7·68
8	3·16	8	4·69	8	6·20	8	7·73
9	3·21	9	4·74	9	6·25	9	7·78
6·0	3·26	9·0	4·79	12·0	6·30	15·0	7·84

Die polarimetrische Milchzuckerbestimmung.

Dieses Verfahren gründet sich auf der Eigenschaft der Milchzuckerlösung, die Polarisationsebene zu drehen. Aus dem spezifischen Drehungsvermögen des Milchzuckers, dem Drehungswinkel der Lösung und dem spezifischen Gewicht der Lösung kann man den Prozentgehalt der Milch an Milchzucker ermitteln (Gewichtsprozente).

Scheibe[1]) hat folgende Methode ausgearbeitet:

75 *cm*³ Milch werden mit 7·5 *cm*³ einer 20%igen (Gewichtsprozente) Schwefelsäure und 7·5 *cm*³ einer Quecksilberjodidlösung[2]) versetzt, auf 100 *cm*³ aufgefüllt und filtriert. Das Filtrat kann man in einem 1 *dm*-Rohr bei 17·5° polarisieren.

[1]) *Scheibe*, l. c.

[2]) Hergestellt aus 40 *g* Jodkalium in 200 *cm*³ Wasser gelöst, mit 55 *g* Quecksilberjodid geschüttelt, auf 500 *cm*³ aufgefüllt und vom eventuellen geringen ungelösten Quecksilberjodid abfiltriert.

Bei Benutzung des Halbschattenapparates mit doppelter Quarzkeilkompensation von *Schmidt* und *Hänsch* entspricht ein Saccharimetergrad 0·1643 *g* Milchzucker in 100 *cm*³ Lösung.[1])

Werden Polarisationsapparate mit Kreisteilung und Natriumlicht gebraucht, so wird bei 20° polarisiert und der Prozentgehalt aus der Formel $x = \frac{1903 \cdot 7}{m} \cdot \frac{\alpha}{l}$ berechnet[2]), wobei m die Menge der Milch in *g*, α = den abgelesenen Drehungswinkel und l die Länge des Rohres bedeutet.

Zur Korrektur des durch das Volumen des Niederschlages hervorgerufenen Fehlers multipliziert man den gefundenen Wert mit 0·94, wenn zur Untersuchung eine Milch von 2·5—5% Fett vorlag, bei Magermilch mit 0·97.

Oppenheim[3]) enteiweißt die Milch nach dem Vorschlag von *Michaelis* und *Rona*[4]) mit kolloidalem Eisenhydroxyd.

Es werden 10 *cm*³ Milch mit 13 *cm*³ Wasser verdünnt und dazu tropfenweise unter Umschütteln 7 *cm*³ Ferrum oxydatum dialysatum hinzufügt. Durch ein trockenes Filter wird filtriert und das Filtrat polarisiert.

Nach *Oppenheimers* Angaben sind die Werte um 0·3% höher als die der Gewichtsanalyse.

Bestimmung der Mineralbestandteile in der Milch.[5])

Aschebestimmung: Zur Aschebestimmung wird zunächst eine gewogene Menge Milch (will man eine Alkalianalyse durchführen, so nimmt man 25 *cm*³) in einer gewogenen Platinschale mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt und bis zur Trockene eingedampft. Die Trockensubstanz wird vorsichtig unter fortwährendem Fächeln des Bunsenbrenners verkohlt. Die verkohlte Masse wird mit heißem Wasser ausgelaugt, indem man die Kohle vorsichtig zerbröckelt und die wässerige Flüssigkeit durch ein kleines, aschefreies Filterchen unter mehrmaligem Auswaschen mit heißem Wasser filtriert, bis ein Tropfen des Filtrates keine Chlorreaktion mehr gibt. (Ansäuern mit Salpetersäure und Zugabe von $AgNO_3$.) Das Filterchen samt zurückgehaltener Kohle wird wieder in die Platinschale zurückgelegt und das Ganze durch kurzes Trocknen (im Trockenschrank) vom Wasser befreit. Darauf wird die Kohle so lange geglüht, bis sie nicht mehr sichtbar ist und ein grauweißer Rückstand zurückbleibt.

---

[1]) Bei 4 *cm* Rohrlänge; Genaues über Polarisationsapparate siehe *Biehringer*, Optische Untersuchungsmethoden, 1, 583 dieses Handbuches.

[2]) *Fleischmann*, Lehrb. d. Milchwirtschaft. 72. 1908. *Landolt*, Das optische Drehungsvermögen. 445. 1898.

[3]) *Oppenheim*, Die Bestimmung des Milchzuckergehaltes der Milch mit der „Eisenmethode von *Michaelis* und *Rona*. Chem. Ztg. 33. 927. 1909.

[4]) *Rona* und *Michaelis*, Untersuchungen über den Blutzucker. Bioch. Zeitschr. 7. 329. 1908.

[5]) Die genaue Ausführung aller Operationen siehe: *Aron*, Aschenanalyse, Bd. 1 dieses Handbuches. 372.

Man muß sich dieses Auslaugeverfahrens bedienen, weil bei einem über die Rotglut gehenden Erhitzen die bei dieser Temperatur flüchtigen Alkalichloride verloren gehen würden. Enthält der grauweiße Rückstand noch kleine Partikelchen von unverbrannter Kohle, so benetzt man ihn mit einigen Tropfen Wasser und glüht gelinde.

Durch Wiederholen dieser Prozedur kann man bis auf kleinste Spuren, die von der Asche eingeschlossen sind, letztere von der Kohle befreien. Zu diesem Rückstand gießt man das durch Auslaugen erhaltene Filtrat in die Platinschale zurück, dampft auf einem Wasserbade bis zur Trockene ein, glüht ganz kurz bis zur Rotglut und wägt möglichst schnell nach dem Erkalten.

Die Asche der Kuhmilch enthält folgende Bestandteile: Kalium, Natrium, Kalzium, Magnesium, Eisen, Chlor, Phosphorsäure, Schwefelsäure und Kohlensäure.

Söldner[1]) gibt die wahrscheinliche Zusammensetzung der Kuhmilchasche an:

	Prozent
Chlornatrium	10·62
Chlorkalium	9·16
Monokaliumphosphat	12·77
Dikaliumphosphat	9·22
Kaliumzitrat	5·47
Dimagnesiumphosphat	3·71
Magnesiumzitrat	4·05
Dikalziumphosphat	7·42
Trikalziumphosphat	8·90
Kalziumzitrat	23·55
Kalziumoxyd an Kasein gebunden	5·13

Nach *König*[2]) enthält die Kuhmilchasche in Prozenten:

K_2O	24·65
Na_2O	8·18
CaO	22·42
MgO	2·59
Fe_2O_3	0·29
SO_3	2·52
P_2O_5	26·28
Cl	13·95

Die durchschnittliche Zusammensetzung der Frauenmilchasche wird ebenfalls von *Söldner*[3]) wie folgt angegeben:

[1]) *Söldner*, l. c.

[2]) *König*, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel. Bd. 2. 603, 1904.

[3]) *Söldner*, Die Aschenbestandteile des neugeborenen Menschen und der Frauenmilch. Zeitschr. f. Biolog. 44. 71. 1903.

	Prozent
K_2O	32·4
Na_2O	13·1
CaO	13·9
MgO	1·9
Fe_2O_3	0·07
P_2O_5	11·40
SO_3	3·3
Cl	21·7

Bestimmung der Alkalien.

Man kann den Ascherückstand (aus der Bestimmung der Asche) direkt zur Ermittlung des Gehalts an Kalium und Natrium benutzen.

Man löst die Asche in warmem Wasser unter Hinzufügung einiger Kubikzentimeter verdünnter Salzsäure, erwärmt auf dem Wasserbade, bis die Kohlensäure ausgetrieben ist und dampft ebenfalls auf dem Wasserbade bis zur Trockene ein. Nun nimmt man mit etwas konzentrierter Salzsäure auf, raucht diese bis zur Trockene ab und wiederholt dies zwei- bis dreimal. Dadurch ist die eventuell in der Asche vorhandene Kieselsäure unlöslich geworden. Nunmehr wird mit heißem Wasser und etwas Salzsäure der Inhalt der Schale gelöst und vom eventuellen Rückstand abfiltriert. Dieser besteht aus kleinsten Partikelchen unverbrannter Kohle und geringen Mengen Kieselsäure.

Filtriert man nun einerseits durch ein vorher gewogenes (bei 105° getrocknetes) aschefreies Filterchen und wägt den getrockneten Rückstand + Filter, verbrennt aber andrerseits das Filter in einem gewogenen Porzellantiegel und wägt die zurückbleibende Kieselsäure, so erfährt man aus der Differenz die Menge der noch unverbrannten, in der Asche beigemengten Kohle.

Handelt es sich um eine ganz exakte Aschenbestimmung, so muß man jene unverbrannte Kohlenmenge von der ursprünglichen Aschenmenge abziehen. Das salzsaure Filtrat wird mit etwas Eisenchlorid versetzt, zur Trockene verdampft, der Rückstand mit heißem Wasser und einigen Tropfen HCl aufgenommen, eventuell filtriert und das Filtrat zunächst mit Chlorbaryum bis zum bleibenden Niederschlag (Umwandlung in Chloride) und nachher mit gesättigter Barythydratlösung bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt (Magnesiumausfällung). Man filtriert den Niederschlag ab, wäscht mit kaltem Wasser nach und versetzt das Filtrat mit Ammoniumkarbonat in stark ammoniakalischer Lösung (Ausfällen von Kalzium und Baryum als Karbonate). Nachdem das Filtrat bis zur Trockene eingedampft und durch Abrauchen von Ammonsalzen befreit (Vorsicht!) worden ist, löst man den Rückstand mit Wasser und fällt nochmals mit Ammoniumkarbonat + Ammoniak. Das Filtrat wird eingedampft, das Abrauchen der Ammonsalze wiederum vorgenommen und der Rückstand in Wasser und wenig Salzsäure gelöst.

Diese Lösung enthält nur Kalium- und Natriumchlorid. Dampft man die Lösung in einer gewogenen Platinschale bis zur Trockene ein, glüht kurze Zeit schwach (bis zur Rotglut) und wägt, so hat man die Summe der Alkalichloride.

Aus der wässerigen Lösung dieser Alkalichloride kann man das Kalium mit Platinchlorid als Kaliumplatinchlorid ausfällen[1]) und auf diese Weise auch das Natriumchlorid indirekt bestimmen. Statt durch trockene Veraschung, wobei sich wegen der Flüchtigkeit der Alkalichloride kleine Fehler einschleichen, ist diese Bestimmung auch mittelst der feuchten Veraschung ausführbar. Die *Neumann*sche Veraschungsflüssigkeit wird vorsichtig eingedampft, auf einem Finckener Turm die Schwefelsäure abgeraucht, mit Wasser aufgenommen und wie oben weiterbehandelt.

Es sei hier noch darauf hingewiesen, daß man in der Asche direkt Ca, Mg, K und Na bestimmen kann. Die salzsaure Aschelösung wird auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und in zwei Teile geteilt. In dem einen bestimmt man Kalium und Natrium, im anderen Magnesium und Kalzium.[2])

Bestimmung des Kalziums und Magnesiums.

25 cm^3 Milch werden zunächst mit 10—15 cm^3 konzentrierter Salpetersäure im Kjeldahlkolben bis auf ein kleines Volumen eingedampft und dann nach *Neumann* verascht. Nach der Veraschung und Zersetzung der Nitrosylschwefelsäure durch Kochen spült man quantitativ die Flüssigkeit, nachdem sie kalt geworden, in ein Becherglas über, macht stark ammoniakalisch und darauf schwach essigsauer, filtriert von dem eventuell ungelöst bleibenden Eisenphosphat ab und fällt das Kalzium mit Ammoniumoxalat aus. Bestimmung als Oxyd. Das Filtrat des Kalziumoxalatniederschlages wird auf $^1/_3$ Volumen eingeengt, das darin befindliche Magnesium als Magnesiumammoniumphosphat gefällt und als Magnesiumpyrophosphat gewogen.

Man kann das Kalzium, das in der *Neumann*schen Veraschungsflüssigkeit als Kalziumsulfat vorliegt, auch direkt mit Alkohol fällen, durch einen gewogenen Goochtiegel filtrieren und als Kalziumsulfat zur Wägung bringen (Methode nach *Aron*[3]).

Für die Bestimmung des Kalziums in der Frauenmilch soll man mindestens 100 cm^3 gebrauchen.[4])

Bestimmung der Phosphorsäure.

10 cm^3 Milch werden nach *Neumann* verascht, die Flüssigkeit wird unter der Voraussetzung, daß man nicht mehr als 20 cm^3 Säuremischung

[1]) Nach bekannten Methoden, Aschenanalyse *Aron*. Bd. 1. 410 dieses Handbuches.

[2]) Siehe Näheres *Aron*, Bd. 1. 405 dieses Handbuches.

[3]) *H. Aron*, Eine einfache Methode zur Bestimmung des Kalziums in organischen Substanzen. Biochem. Zeitschr. IV. 268. 1908.

[4]) *Bahrdt* und *Edelstein*, Das Kalkangebot in der Frauenmilch. 72. Ergänzungsheft. S. 16. 1910.

zur Oxydation verbraucht hat, mit etwa 120 *cm*³ Wasser verdünnt, mit 50 *cm*³ einer 50⁰/₀igen Ammoniumnitratlösung versetzt, auf etwa 70° erhitzt und die Phosphorsäure mit 40 *cm*³ Ammoniummolybdatlösung gefällt.

Zur weiteren Bestimmung wird nach *Neumann* folgendermaßen verfahren:

Nachdem man den Niederschlag tüchtig umgeschüttelt und das Ganze 15 Minuten hat stehen lassen, filtriert man durch einen Goochtiegel, wäscht so lange mit eiskaltem Wasser, bis sowohl der Niederschlag, die Wände des Goochtiegels sowie der Kolben, in welchem die Fällung vorgenommen wurde, keine Spur mehr sauer reagieren. Darauf löst man den gelben Niederschlag aus dem Goochtiegel in denselben Kolben mit einer bestimmten Menge $\frac{n}{2}$ Natronlauge hinein, bis die gelbe Färbung verschwunden ist. Nach Zusatz von einigen Kubikzentimetern $\frac{n}{2}$ Natronlauge im Überschuß erhitzt man die farblose Flüssigkeit so lange, bis die Dämpfe nicht mehr alkalisch reagieren (Prüfung mit feuchtem Lackmuspapier), also alles Ammoniak verjagt ist.

Es ist zweckmäßig, vor dem Erhitzen 2—3 kleine Glaskügelchen in die Flüssigkeit hineinzuwerfen, die das Stoßen der siedenden Flüssigkeit verhindern.

Man läßt erkalten und titriert unter Zugabe von Phenolphtalein (Rotfärbung) mit $\frac{n}{2}$ Schwefelsäure den zum Lösen des Phosphormolybdänniederschlages nicht verbrauchten Überschuß an Natronlauge bis auf farblos zurück.

Da aber Phenolphtalein der Kohlensäure gegenüber empfindlich ist, so umgeht man die kleinen Fehler der Titration dadurch, daß man einen Überschuß an $\frac{n}{2}$ Schwefelsäure zugibt, durch längeres Sieden (30 Minuten) die Kohlensäure vertreibt und nach dem Erkalten mit $\frac{n}{2}$ Natronlauge bis auf Rot zurücktitriert.

$$(NH_4)_3\,PO_4 \,.\, 24\,Mo\,O_3 \,.\, 4\,HNO_3 + 56\,Na\,OH =$$
$$= 2\,Na_2\,HPO_4 + 24\,Na_2\,Mo\,O_4 + 4\,Na\,NO_3 + 6\,NH_3 + 32\,H_2\,O.$$

1 *cm*³ $\frac{n}{2}$ Natronlauge entspricht 1·267 *mg* $P_2\,O_5$.[1]) Will man nicht das *Neumann*sche Titrationsverfahren benutzen, so kann man den gelben Phosphormolybdänniederschlag in Ammoniak lösen, daraus die Phosphorsäure als Magnesiumammoniumphosphat ausfällen und als Magnesiumpyrophosphat zur Wägung bringen.[2])

[1]) 1 Mol. $P_2\,O_5$ entspricht 56 *g*-Mol. NaOH oder 56 *l* n-NaOH, 1 *l* n-NaOH entspricht $\frac{P_2\,O_5}{56}$ *g* $P_2\,O_5$, 1 *cm*³ = 2·535 *mg* $P_2\,O_5$, 1 *cm*³ $\frac{n}{2}$ NaOH = 1·267 *mg* $P_2\,O_5$.

[2]) Genaue Vorschrift *Aron*, Aschenanalyse. Bd. 1. 420 dieses Handbuches.

Schwefelsäurebestimmung.

Die Milch enthält eine ganz geringe Menge Schwefelsäure, die in der Asche enthaltene stammt wahrscheinlich nur aus den Eiweißkörpern der Milch.

25—50 *cm*³ werden in einer Platinschale abgewogen, eingedampft, mit einer Salpetermischung (3 Gewichtsteile KNO_3 + 1 Gewichtsteil Na_2CO_3) verascht, in Wasser gelöst, einigemal mit Salzsäure abgeraucht und dann Schwefelsäure als Baryumsulfat bestimmt.

Chlor.

Zur Chlorbestimmung wird die eingedampfte Milch (5—10 *cm*³) mit einer Salpetermischung verascht, in Wasser aufgenommen und mit Salpetersäure so lange vorsichtig versetzt, bis keine Kohlensäureentwicklung mehr stattfindet.

Man fällt dann mit $\frac{n}{2}$ Silbernitratlösung oder einer empirischen Silberlösung das Chlor als Chlorsilber aus (20 *cm*³ Silbernitrat), füllt auf 100 auf, filtriert durch ein trockenes Filter und titriert im aliquoten Teil des Filtrates den Überschuß an Silbernitrat mit $\frac{n}{10}$ Rhodankaliumlösung zurück, unter Anwendung von Eisenammoniakalaun als Indikator.

Aus der gebrauchten Menge Silbernitrat berechnet man durch Umrechnung auf die ganze Menge den Gehalt an Chlor.

Es empfiehlt sich, nicht in der gewöhnlichen Asche der Milch das Chlor zu bestimmen, weil bei der trockenen Veraschung Verluste an Chlor unvermeidlich sind.

Eisen.

In Anbetracht der minimalen Eisenmenge, sowohl in der Frauen-[1]) als in der Kuhmilch, soll man zur Bestimmung mindestens 500 *g*, womöglich noch mehr Milch verwenden. Die am meisten zu empfehlende Methode ist die jodometrische nach *Neumann*.

Diese beruht auf dem Prinzip, daß in kleiner Menge vorhandenes Eisen mit Zinkammoniumphosphat quantitativ mit niedergeschlagen wird. In salzsaurer Lösung scheidet das Eisen aus einer Jodkaliumlösung äquivalente Mengen Jod aus, die durch Titrieren mit Natriumthiosulfat bestimmt werden.[2])

Neuerdings haben *Lachs* und *Friedenthal*[3]) eine neue Methode vorgeschlagen, und zwar eine kolorimetrische.

Prinzip: Eine eisenhaltige salzsaure Lösung gibt mit Rhodankalium eine rote Farbe. Diese blutrote Färbung rührt von dem undissoziierbaren

---

[1]) Siehe *Bahrdt* und *Edelstein*, Ein Beitrag zur Kenntnis des Eisengehaltes der Frauenmilch usw. Zeitschr. f. Kinderheilk. 1. 182. 1910.

[2]) Genaue Vorschrift: *Aron*, Aschenanalyse. Bd. 1, 414 dieses Handbuches.

[3]) *Lachs* und *Friedenthal*, Die Bestimmung des Eisens auf kalorimetrischem Wege. Biochem. Zeitschr. 32. 130. 1911.

Eisenrhodanid her. Schüttelt man die Flüssigkeit mit Äther aus, so entfernt man das undissoziierte Ferrirhodanid, welches in Äther löslich ist. In dem Maße, wie der undissoziierte Teil an $Fe(CNS)_3$ entfernt ist, bildet sich von neuem in der wässerigen Lösung ein undissoziierter Teil derselben, der wieder in Äther geht.

Stellt man eine Reihe von ätherischen Lösungen von Eisenrhodanid aus der Reihe nach verdünnten bekannten Eisenlösungen her, so kann man sie als Vergleichslösungen mit der roten Farbe der untersuchten Flüssigkeit benutzen.

Man dampft 5 *cm*³ Milch in einer Platinschale ein, verascht sie, nimmt die Asche mit 1 *cm*³ Wasser und 1 *cm*³ 6 × n-Salzsäure auf, versetzt mit 1 *cm*³ konzentrierter Rhodankaliumlösung und schüttelt diese mit 1 *cm*³ Äther aus. Es entsteht dabei eine schöne rote Lösung, die man mit der Farbenskala vergleicht.

Die Methode scheint sehr bequem zu sein[1]), ist aber für Frauenmilch nicht anwendbar. In 1 *l* Milch wurden 1·3 *mg* Eisen gefunden.

Die Vergleichslösungen stellt man sich her, indem man aus einer Lösung, die 10^{-4} $Fe^{\cdots}$ (0·0001 *g* 3wertiges Eisen) in 1 *cm*³ enthält, in eine Reihe Reagenzgläser 1 *cm*³ bzw. 0·8 bzw. 0·5 etc. *cm*³ überträgt. Genau dasselbe macht man mit einer Lösung, die 10^{-5} $Fe^{\cdots}$ in 1 *cm*³ enthält. Diese Reagenzgläser füllt man bis auf 1 *cm*³ mit Wasser auf, fügt zu jedem 1 *cm*³ einer eisenfreien, 6fach normalen Salzsäure zu und versetzt mit 1 *cm*³ konzentrierter Rhodankaliumlösung. Jede einzelne dieser Lösungen wird mit 1 *cm*³ Äther aufgeschüttelt. Die ätherischen Schichten stellen dann eine Farbentonskala dar.

Übrige Bestandteile der Milch.

Orotsäure, $C_5H_4O_2N_2 \cdot H_2O$.

Biscaro-Belloni[2]) haben diese Säure, die ihrer Konstitution nach ein Ureïd ist (mit Kaliumpermanganat oxydiert, liefert sie Harnstoff), in der Milch entdeckt.

Sie ist anscheinend für die Milch spezifisch. Ob sie auch in der Frauenmilch vorhanden ist, ist noch nicht nachgewiesen. Man stellt sie folgendermaßen dar: Mit Lab wird das Kasein in der Milch ausgefällt, das Eiweiß durch Erhitzen unter Zusatz von etwas Essigsäure entfernt und das Filtrat mit Natriumkarbonat bis zur schwachsauren Reaktion versetzt. Zu dieser Lösung wird Kalziumkarbonat hinzugefügt und wieder filtriert. Darauf fällt man die Säure mit basischem Bleiazetat aus, zersetzt den

[1]) Wenn, was noch nachzuprüfen ist, unter Anwendung von nur 5 *cm*³ Milch eine exakte Ermittlung des Eisengehaltes möglich ist, so bedeutet dieses Verfahren einen Fortschritt, weil man sonst sehr große Mengen Analysenmaterial braucht und das Eindampfen der Milch für die feuchte Veraschung sehr lästig und langwierig ist.

[2]) *Biscaro* und *Belloni*, Über einen neuen Bestandteil der Milch, zitiert nach Chem. Zentralbl. Bd. 2. 63. 1905.

Niederschlag mit Schwefelwasserstoff, filtriert vom Bleisulfid ab und dampft das Filtrat ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, zur Reinigung mit Tierkohle aufgekocht und filtriert.

Man gibt zur Lösung Alkali bis zur schwach sauren Reaktion und dampft ein. Den kristallinischen Rückstand läßt man mit 35% Alkohol 2 Tage stehen. Auf diese Weise werden die Chloride (Bleichloride) entfernt. Es wird nochmals 24 Stunden mit wenig Alkohol dekantiert und schließlich aus siedendem Wasser umkristallisiert.

Zitronensäure.

Die Kuhmilch enthält 0·12—0·2% dieser Säure. Die Methode ihrer quantitativen Bestimmung hat *Scheibe*[1]) ausgearbeitet. Sie beruht auf der Eigenschaft der Zitronensäure, sich durch Oxydation mit Kaliumbichromat in schwefelsaurer Lösung in Kohlensäure und Wasser zu verwandeln. Nimmt man nun einen Überschuß von Kaliumbichromat und titriert den zur Oxydation nicht verbrauchten Teil mit einer Ferroammoniumsulfatlösung zurück, so erfährt man daraus die zur Oxydation verwendete Menge Bichromat und daraus den Gehalt an Zitronensäure. Die Methode wird wie folgt ausgeführt.

400 *cm*³ Milch versetzt man mit 4 *cm*³ 2½facher n-Schwefelsäure[2]), kocht auf, gibt 10 *g* mit Wasser verriebene spanische Klärerde zu, kocht nochmals auf, spült nach dem Erkalten in einem 500 *cm*³-Meßkolben und füllt bis zur Marke auf. Das Filtrat muß völlig klar sein. Ist das nicht der Fall, so muß die Klärung wiederholt werden.

100 *cm*³ des klaren Filtrates (entsprechend 80 *cm*³ Milch) werden mit so viel Barytwasser versetzt, bis die in den 100 *cm*³ enthaltenen 0·6 *cm*³ 2½fach n-H_2SO_4 neutralisiert sind und dampft bis zur Sirupkonsistenz ein. Hierauf setzt man die Zitronensäure in Freiheit, indem unter Umrühren 3·2 *cm*³ einer 2½fach n-Schwefelsäure zugesetzt werden, vermischt unter weiterem Umrühren allmählich mit 20 *cm*³ absolutem Alkohol und nach kurzem Absetzenlassen mit 60 *cm*³ Äther. Darauf saugt man den Niederschlag (der ausgefällte Milchzucker) auf einer Siebplatte aus Porzellan ab. und wäscht ihn mit einer Alkohol-Äthermischung aus (20 *cm*³ absoluter Alkohol und 60 *cm*³ Äther). Das klare Filtrat wird mit alkoholischem Ammoniak bis zur bleibenden Trübung neutralisiert und in einem Destillierkolben zunächst der Ätheralkohol abdestilliert und dann durch weitere Destillation auf etwa 20 *cm*³ konzentriert. Dieser Rückstand wird mit 60 *cm*³ absolutem Alkohol im Wasserbad zum Kochen erhitzt und mit 10 *cm*³ alkoholischem Ammoniak die Zitronensäure als Ammoniumsulfat vollständig ausgefällt. Man läßt einige Stunden stehen und dekantiert durch ein Filter von der darüberstehenden Flüssigkeit ab. Das Ammoniumzitrat wird zur weiteren

[1]) *Scheibe*, Über den Ursprung der Zitronensäure als Bestandteil der Milch. Die Landwirtschaftl. Versuchsstationen. 39. 153. 1891.

[2]) 1 Teil verdünnter Schwefelsäure (D = 1·16) mit 1 Teil Wasser verdünnt.

Reinigung mit 1 cm^3 Schwefelsäure (2·5fach n), 1 cm^3 Wasser und 60 cm^3 absolutem Alkohol versetzt und wiederum mit 10 cm^3 alkoholischem Ammoniak gefällt.

Um das Absetzen des zitronensauren Ammoniums zu beschleunigen, erhitzt man eine halbe Stunde unter Zusatz von 2—3 *g* Ammoniumkarbonat am Rückflußkühler. Man läßt einige Stunden stehen, bis die Flüssigkeit ganz klar ist und der Niederschlag sich kristallinisch abgesetzt hat. Man saugt ihn auf einer Porzellanplatte ab, wäscht mit absolutem Alkohol nach, löst den Niederschlag in Wasser und konzentriert die Lösung auf etwa 20 cm^3.

Diese konzentrierte Lösung des Ammoniumzitrates wird mit 20—30 cm^3 (Überschuß) Kaliumbichromatlösung und unter Umschütteln mit 20—25 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Durch $^1/_4$stündiges Erhitzen auf etwa 80° wird die Zitronensäure in Kohlensäure und Wasser umgewandelt.

$$C_6H_8O_7 + 3\,K_2Cr_2O_7 + 12\,H_2SO_4 = 3\,K_2SO_4 + 3\,Cr_2(SO_4)_3 + 16\,H_2O + 6\,CO_2.$$

Die Lösung, die eigentlich grün sein müßte (Chromisalz), ist wegen des Überschusses an Kaliumbichromat etwas braun gefärbt. Man verdünnt mit zirka 50 cm^3 Wasser, setzt Ferroammoniumsulfat im Überschuß zu, bis der grünbraune Farbenton in reines Grün übergeht und titriert mit soviel Bichromatlösung zurück, bis 1 Tropfen der Flüssigkeit mit 1 Tropfen Ferrocyankalium zusammengebracht (Tüpfeln) keine Blaufärbung mehr gibt. Auf 1 Mol. Zitronensäure braucht man 3 Mol. Kaliumbichromat. Die Kaliumbichromatlösung stellt man sich her durch Lösen von 46·1 *g* des Salzes zu 1 *l* (1 cm^3 Kaliumbichromatlösung entspricht 0·0102 *g* Zitronensäure); die Eisenlösung, indem man 150 *g* Ferroammoniumsulfat (*Mohr*sches Salz) in 700 cm^3 Wasser löst, dazu 100 cm^3 konzentrierter Schwefelsäure zusetzt und auf 1 *l* auffüllt.

Nach *E. Desmoulière*[1]) kocht man 200 cm^3 Milch kurze Zeit mit 100 cm^3 2%iger Essigsäure am Rückflußkühler, filtriert nach dem Erkalten und dampft 150 cm^3 des Filtrats auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein. Nach Zusatz von 2—3 *g* gereinigten Kieselgurs dampft man weiter bis zur Trockene ein, setzt nach dem Erkalten 3 cm^3 verdünnter Schwefelsäure zu und läßt 2—3 Stunden stehen, unter zeitweiligem Umrühren. Man fügt nochmals 3 *g* Kieselgur hinzu und extrahiert das Ganze mit kaltem, wassergesättigtem Äther aus, bis man 1000 cm^3 Ätherauszug hat. Der Äther wird bei niedriger Temperatur rasch abgedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. In einem bestimmten Teil der Flüssigkeit wird die Gesamtazidität bestimmt und die Phosphorsäure, wenn sie anwesend ist. In einem anderen Teil werden die flüchtigen Säuren bestimmt. Die Differenz soll die Menge an vorhandener Zitronensäure ergeben.

[1]) *Desmoulière*, Untersuchung über die Bestimmung der Zitronensäure in der Milch. Bull. de Sciences Pharmacol. 17. 588, 1910, zitiert nach Chem. Zentralblatt. 2. 1952. 1910.

Nach dieser Methode fand *Desmoulière* in 100 cm^3 Kuhmilch 0·22 *g* (im Mittel), in 100 cm^3 Frauenmilch 0·078 *g* Zitronensäure. Bei Anwendung dieser Methode in der Frauen-, Schaf- oder Eselinnenmilch soll man die Menge der zuzugebenden Schwefelsäure auf 2 cm^3 herabsetzen. Die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens ist noch nicht nachgeprüft worden.

Außerdem enthält die Milch noch verschiedene Enzyme oder Fermente, und zwar:

1. eiweißspaltende (proteolytische),
2. kohlehydratspaltende (amylolytische),
3. fettspaltende (Lipasen),
4. Oxydations- und Reduktionsfermente (Oxydasen, Katalasen und Reduktasen).

Der Anwesenheit der letzteren sind verschiedene Reduktions- und Oxydationseigenschaften der Milch gegenüber bestimmten Reagenzien zuzuschreiben. Bei einer Temperatur von über 75° werden diese Fermente zerstört. Diese Eigenschaft ist zur praktischen Milchuntersuchung herangezogen worden, und zwar zum Nachweis einer stattgehabten Erhitzung der Milch. In einer gekochten Milch kommen nämlich die Reaktionen nicht mehr zustande. Das gilt aber bestimmt nur für die Oxydationsreaktionen, weil die Reduktasen auch in gekochter Milch wieder erscheinen können. Dagegen sind die Reduktasereaktionen zur Untersuchung darüber, ob eine rohe Milch noch frisch ist, gut zu verwenden. *Seligmann*[1]) nimmt folgende Unterscheidung vor:

Oxydasen besitzen:

1. die Fähigkeit, Wasserstoffsuperoxyd in Wasserstoff und Sauerstoff zu spalten (Superoxydase nach *Raudnitz*);
2. die Fähigkeit, eine Reihe von Oxydationen zu vermitteln (Oxydase);
3. die Fähigkeit, nur bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd die Oxydationen auszulösen. Das H_2O_2 scheint beschleunigend zu wirken (indirekte Oxydase).

Reduktasen besitzen:

1. die Fähigkeit, Schwefelwasserstoff zu reduzieren (Hydrogenase);
2. die Fähigkeit, Methylenblau zu entfärben;
3. die Fähigkeit, eine Mischung von alkoholischer Methylenblaulösung mit einer wässerigen Lösung von Formaldehyd (*Schardingers* Reagens) zu entfärben (Aldehydkatalase).

Die einzelnen Reaktionen werden folgendermaßen ausgeführt:

Oxydasen.

Nach *Arnold*[2]) wird frische, ungekochte Milch mit Guajaktinktur (hergestellt durch Auflösen von Guajakharz in Alkohol) versetzt, worauf

[1]) *Seligmann*, Über den Einfluß einiger Aldehyde, besonders des Formalins, auf die Oxydationsfermente der Milch und des Gummi arabicum. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, Bd. 50. 97. 1905 und Handbuch der Milchkunde von *Sommerfeld*. 322. 1909

[2]) *Arnold*, Einige neue Reaktionen der Milch. Zeitschr. f. anal. Chemie. 21. 285. 1882.

sofort eine Blaufärbung eintritt. Gekochte Milch zeigt diese Reaktion nicht. Man kann statt Guajaktinktur auch einen Auszug von Guajakholz mit Azeton verwenden.[1]) Nach *Storch*[2]) setzt man zu 10 *cm*³ ungekochter Milch 1 Tropfen 0·2⁰/₀iger Wasserstoffsuperoxydlösung und 2 Tropfen 2⁰/₀iger Paraphenylendiaminlösung zu und schüttelt stark um (Blaufärbung). *Wilkinson* und *Peters*[3]) bedienen sich zu dieser Reaktion des Benzidins (Di-p-diamidodiphenyl): Blaufärbung bei Zugabe von 2 *cm*³ einer 4⁰/₀igen alkoholischen Benzidinlösung, 2—3 Tropfen Essigsäure und 2 *cm*³ einer 3⁰/₀igen Wasserstoffsuperoxydlösung zu 10 *cm*³ Milch.

Rothenfusser[4]) führt diese Reaktionen nicht direkt in der Milch, sondern im Serum aus. Er enteiweißt 100 *cm*³ Milch mit 6 *cm*³ Bleiessig (Bleisubazetat), filtriert und versetzt 10 *cm*³ Serum mit 1—2 Tropfen 0·3⁰/₀igem Wasserstoffsuperoxyd. Als Reagens wendet er entweder einige Tropfen von salzsaurem Paraphenylendiamin an (1 *g* dieser Verbindung in 15 *cm*³ Wasser gelöst und mit einer Auflösung von 2 *g* Guajakol in 135 *cm*³ 96⁰/₀igen Alkohols vermischt) oder 5—10 Tropfen einer 2⁰/₀igen alkoholischen Benzidinlösung unter Zusatz von etwas Essigsäure. Im ersten Falle tritt bei einer ungekochten Milch eine violettblaue, im zweiten eine kornblumenblaue Farbe auf.

Reduktasen.

Nach *Schardinger*[5]) wird eine Mischung von alkoholischer Methylenblaulösung mit Formalin (5 *cm*³ gesättigter alkoholischer Methylenblaulösung gemischt mit 190 *cm*³ Wasser und 5 *cm*³ Formalin) von frischer, ungekochter Milch entfärbt.

Nach *Barthel*[6]) versetzt man 10 *cm*³ Milch mit 0·5 *cm*³ einer alkoholischen Methylenblaulösung, überschichtet mit einigen Kubikzentimetern flüssigem Paraffin und stellt in ein Wasserbad von 40—45⁰. Tritt eine Entfärbung nach einigen Minuten ein, so ist die Milch stark bakterienhaltig. Tritt sie dagegen nicht innerhalb von 3 Stunden ein, so ist die Milch als gut zu bezeichnen.

---

[1]) *Arnold* und *Mentzel*, Die Guajakprobe in der Praxis. Milchzeitung. 31. 247. 1902.

[2]) *K. Storch*, Eine Methode zur Unterscheidung von pasteurisierter und nicht pasteurisierter Milch. Milchzeitung. 27. 374. 1898.

[3]) *Wilkinson* und *Peters*, Neue Reaktion zur Unterscheidung von roher und erhitzter Milch etc. Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel. 16. 172. 1908.

[4]) *Rothenfusser*, Über den Nachweis von Fermenten unter besonderer Berücksichtigung der Milch. Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 16. 63. 1908.

[5]) *Schardinger*, Über das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- und Genußmittel. Bd. 5. 1113. 1902.

[6]) *Barthel*, Verwendbarkeit der Reduktaseprobe zur Beurteilung der hygienischen Beschaffenheit der Milch. Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 15. 385. 1908.

Der Nachweis und die Bestimmung anderer Bestandteile der Milch, die entweder zufällig oder absichtlich (Verfälschungen) in ihr vorkommen (Konservierungsmittel wie Borsäure, Salizylsäure, Formaldehyd; ferner Mehl, Zucker, Saccharin, Schmutz etc.), gehört nicht in den Rahmen dieser Darstellung.[1])

Physikalische Methoden.

(Zugleich eine Untersuchung der Milch auf ihre Verwässerung.)

Hierzu gehören die Bestimmungen:

1. der Gefrierpunktserniedrigung,
2. der elektrischen Leitfähigkeit,
3. des Brechungsvermögens von Milchserum.

1. Gefrierpunktserniedrigung.

Unter dem Gefrierpunkt verstehen wir den Punkt, bei welchem eine Lösung beginnt, ihr Lösungsmittel in fester Form, und zwar als Eis, abzuscheiden.

Es ist bekannt, daß, wenn man in einer Flüssigkeit eine Substanz auflöst, der Gefrierpunkt dieser Lösung niedriger wird, als der Gefrierpunkt der Flüssigkeit selber. Die Differenz zwischen den Gefrierpunkten der reinen Flüssigkeit und der Lösung ist die Gefrierpunktserniedrigung. Löst man z. B. in 100 *cm*³ Wasser 1 *g* Kochsalz, so sinkt der Gefrierpunkt des Wassers von 0° auf —0·6°.

Raoult und *Van't Hoff* haben gezeigt, daß die Gefrierpunktserniedrigung für ein Grammolekül (Mol) für ein und dasselbe Lösungsmittel eine konstante Größe ist. Oder mit anderen Worten: Durch verschiedene Substanzen, die in gleicher Menge ein und desselben Lösungsmittels im Verhältnis ihrer Molekulargewichte gelöst werden, erniedrigt sich der Gefrierpunkt des Lösungsmittels um eine gleiche Anzahl Grade, unabhängig von der Natur des gelösten Stoffes (molekulare Gefrierpunktserniedrigung).

Man nimmt als Menge des Lösungsmittels 100 *g* an und als Menge der aufgelösten Substanz 1 *g*-Molekül. Die molekulare Gefrierpunktserniedrigung für Wasser beträgt im Mittel aus dem beobachteten und dem berechneten Wert 18·5.

Es ist ohneweiters verständlich, daß sich durch Zusatz von Wasser zur Milch und durch die dadurch hervorgerufene Konzentrationsänderung auch der Gefrierpunktswert ändert. Die Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung führt man genau so aus wie in anderen Lösungen. Am besten im *Beckmann*schen Apparat.[2])

Man muß die Milch zuerst in Eiswasser tief abkühlen und bestimmt zweckmäßig zuerst den Gefrierpunkt des Wassers und dann den der Milch.

[1]) Diese für die Milchwirtschaft und Hygiene äußerst wichtigen Bestimmungen findet man in einschlägigen Büchern, z. B.: *Sommerfeld*, Handbuch der Milchkunde, 1909; *K. Teichert*, Untersuchung der Milch- und Molkereiprodukte, 1909; *Fleischmann*, Lehrbuch der Milchwirtschaft. 1908.

[2]) Genaues hierüber siehe *Friedenthal*, Bd. I. 501 dieses Handbuches.

Zur Ausführung einer Bestimmung genügen etwa 4—8 cm^3 Milch. Nach *Winter*[1]) kann man die zur Milch zugesetzte Wassermenge aus folgender Formel berechnen: $E = V \frac{a-D}{a}$, wo V das Volumen der untersuchten Milch bedeutet, a den normalen Gefrierpunkt der Milch, D die Gefrierpunktserniedrigung und E das der Milch zugesetzte Volumen Wasser. Der Gefrierpunkt der Milch ist konstant und beträgt, wie schon erwähnt, —0·555 *g* im Mittel und schwankt zwischen —0·55 bis —0·57. Der Gefrierpunkt der Frauenmilch ist größeren Schwankungen unterworfen. Die Werte bewegen sich nach *Koeppe*[2]) zwischen 0·495—0·63.

Koeppe schreibt diese Schwankungen dem Einfluß der Nahrung, besonders den Salzen der Nahrung zu.

2. Die elektrische Leitfähigkeit.

Reines Wasser einerseits und z. B. trockenes Salzsäuregas andrerseits leiten den elektrischen Strom nicht. Löst man dagegen das Salzsäuregas in Wasser, so leitet diese Lösung sehr gut die Elektrizität.

Nach der von *Arrhenius* aufgestellten Theorie der elektrolytischen Dissoziation erklärt man sich diesen Vorgang so, daß die in einer wässerigen Lösung positiv und negativ elektrisch geladenen Teilchen (Ionen), in unserem Falle also die positiven Wasserstoffionen und die negativen Chlorionen, die Träger der Elektrizität sind.

Mit zunehmender Verdünnung vergrößert sich die Dissoziation, d. h. die Zahl der Ionen und die elektrische Leitfähigkeit nimmt zu, bis schließlich bei unendlicher Verdünnung die Ionisation vollständig wird. Die Stärke der Säuren und Basen hängt von dem Grade ihrer Ionisation ab, die Stärke der Säuren im speziellen von der Konzentration der Wasserstoffionen. Auch die Azidität und die Alkalität der Milch werden durch die Konzentration der Wasserstoff- und Hydroxylionen bedingt. Saure und geronnene Milch besitzen eine größere Leitfähigkeit.[3])

Über die von *Kohlrausch* ausgearbeitete Bestimmung und ihre Ausführung (gemessen am elektrischen Widerstand mittelst der *Wheatstone*schen Brücke) siehe *Friedenthal*, Band I dieses Handbuches.

Die Leitfähigkeit der Kuhmilch schwankt nach *Koeppe*[4]) zwischen $33·9—94·3 \cdot 10^{-4}$ bei 18° C, bei der Frauenmilch zwischen $14·9—84·3 \cdot 10^{-4}$.

Im Mittel: für Kuhmilch . . . $43·8 \cdot 10^{-4}$
für Frauenmilch . . $22·6 \cdot 10^{-4}$

[1]) *Winter* und *Parmentier*, Die Kryoskopie der Milch etc. zit. nach dem chem. Zentralbl. 2. 1170. 1904.

[2]) *Koeppe*, Vergleichende Untersuchungen über den Salzgehalt der Frauen- und Kuhmilch. Jahrb. f. Kinderheilk. 47. 399. 1898.

[3]) Genaueres über Theorie und Methodik dieses Gebietes findet man in diesem Handbuch: *Friedenthal*, Bd. 1. 534.

[4]) *Koeppe*, l. c.

Nach *Binaghi*[1]) dagegen ist sie für frische, unverfälschte Milch ziemlich konstant.

Sie beträgt für die:

Schafmilch	49·43—51·72
Ziegenmilch	47·01—49·96
Kuhmilch	47·97—49·78

3. Das Lichtbrechungsvermögen des Milchserums.

Das Serum normaler Milch scheint für ein- und dieselbe Milchart ziemlich konstante Brechungswerte zu liefern. Natürlich kommt es auch auf die Art der Gewinnung des Serums an.

Nach *Lythgoe* und *Nurenberg*[2]) liefern die niedrigsten Werte das Chlorkalziumserum, dann das Serum aus spontan geronnener Milch; die höchsten Werte das Essigsäureserum.

Mai und *Rothenfusser*[3]) und *Georg Wiegner*[4]) haben umfangreiche Studien über die Art der Herstellung des Serums und seiner Untersuchung angestellt.

Das Chlorkalziumserum besteht aus Wasser, Milchzucker, Serumeiweiß, Mineralien und Zitronensäure. *Wiegner* hat für diese Bestandteile die spezifische Refraktion bestimmt und hat nachgewiesen, daß die spezifische Refraktion des Serums nur vom Aschegehalt, und zwar in kleinem Maße abhängig ist. Die spezifische Refraktion berechnete er aus der Formel $R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 1} \cdot \frac{1}{d}$, wo n den Brechungsexponenten und d die Dichte bedeutet.

Zur Herstellung des Serums bedient man sich der sehr schnellen und guten Methode nach *Ackermann.*[5])

30 cm^3 Milch werden mit 0·25 cm^3 Chlorkalziumlösung vom spezifischen Gewicht 1·1375 versetzt und in ein Reagenzglas gefüllt. Man verstopft das Reagenzglas mit einem einfach durchbohrten Gummistopfen. Durch die Bohrung führt ein langes enges Rohr, das als Rückflußrohr dient. Man setzt das Glas in ein siedendes Wasserbad und läßt 15 Minuten darin stehen. Dann wird es in kaltes Wasser von 17·5° hineingestellt. Das klare Serum wird auf seinen Brechungsindex durch ein Eintauch-

[1]) *Binaghi,* Die elektrische Leitfähigkeit der Milch und ihre Anwendung zum Nachweis der Verwässerung und eines Zusatzes von Elektrolyten. Biochem. Zeitschr. 29. 60. 1910.

[2]) *Lythgoe* und *Nurenberg,* Ein Vergleich der Methoden zur Darstellung des Milchserums, zitiert nach d. Chem. Zentralbl. 1. 698. 1909. Journ. of Ind. and Engin. Chem. I. 38. 1909.

[3]) *Mai* und *Rothenfusser,* Beiträge zur Kenntnis der Lichtbrechung des Chlorkalziumserums der Milch. Zeitschr. f. Unters. v. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. **16**. 7. 1908.

[4]) *Wiegner* (unter Mitwirkung von *Yakuwa*), Über das Brechungsvermögen und das spez. Gewicht des Chlorkalziumserums der Milch. Milchwirtsch. Zentralbl. V. 473. 1909.

[5]) *Ackermann,* Mitteilung über den refraktometrischen Nachweis des Wasserzusatzes zur Milch. Zeitschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel. 13. 186. 1907.

refraktometer untersucht. Der Brechungswert der Kuhmilch beträgt im Mittel 1·3502.

Es sei noch kurz bemerkt, daß für den Nachweis einer Verwässerung der Milch oft auch die Nitratreaktion verwendet wird. Die normale Milch enthält fast nie salpetersaure Salze. Fällt also die Salpetersäureprobe positiv aus, so rührt das von dem der Milch beigemischten nitrathaltigen Wasser her. Man weist die Salpetersäure nach auf Grund der bekannten Reaktion mit Diphenylamin (Blaufärbung).

Nach *Moeslinger* [1]) kocht man 100 cm^3 Milch mit 1·5 cm^3 einer 20⁰/₀igen Chlorkalziumlösung und filtriert. Ein halber Kubikzentimeter dieses Filtrates wird tropfenweise zu 2 cm^3 einer schwefelsauren Diphenylaminlösung hinzugefügt und einige Minuten stehen gelassen. Die Diphenylaminlösung stellt man sich her, indem man 20 *g* Diphenylamin in 20 cm^3 verdünnter Schwefelsäure löst und auf 100 cm^3 mit reiner, konzentrierter Schwefelsäure auffüllt. Die Reaktion führt man am besten so aus, daß man die Milch in einem Reagenzglas mit der schwefelsauren Diphenylaminlösung vorsichtig unterschichtet.

Nach *Reiss* und *Sommerfeld* [2]) soll man vor allem darauf achten, daß die Flüssigkeiten sich nicht erwärmen.

Der Säuregehalt der Milch.

Frische Milch reagiert gegen Lackmus amphoter. Diese Doppelreaktion rührt nach *Soxhlet* [3]) vom neutralen Alkaliphosphat her, welches alkalisch reagiert, und von dem sauren und sauer reagierenden Alkaliphosphat. Durch Titration kann man den alkalischen und sauren Anteil feststellen. Er fällt verschieden aus, je nachdem man Phenolphtalein, Lackmoid oder einen anderen Indikator anwendet. Überhaupt haben „alle Titrationen mit Indikatoren nur einen konventionellen Wert" (*Raudnitz* [4]).

Die wahre, absolute Reaktion (nach *van Dam* [5]) der potentielle Säuregrad) hängt von der Konzentration der Wasserstoff- und Hydroxyl-Ionen ab, und zwar von dem Verhältnis des Gehaltes der Wasserstoff-Ionen zum Gehalt der Hydroxyl-Ionen *(Friedenthal)*.

Foà [6]) hat denn auch mittelst der elektrometrischen Bestimmung nachgewiesen, daß die Reaktion der frischen Kuhmilch fast neutral ist.

[1]) *Egger* und *Möslinger*, Die Diphenylaminreaktion zum Nachweis der Salpetersäure in der Milch. Bericht über die 7. Versammlung bayrischer Chemiker in Speyer. Berlin 1889. S. 82.

[2]) *Sommerfeld*, Handbuch der Milchkunde. 296. 1909.

[3]) *Soxhlet*, Beiträge zur physiologischen Chemie der Milch. Journ. f. prakt. Chemie. 6. 19. 1872.

[4]) *Raudnitz*, Bestandteile, Eigenschaften und Veränderungen der Milch in: *Asher-Spiro*, Ergebnisse d. Physiologie. 1903. 303.

[5]) *van Dam*, Beitrag zur Kenntnis der Labgerinnung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 58. 295. 1909 und Milchwirtschaftl. Zentralbl. 5. 154. 1909.

[6]) *Foà*, Die Reaktion der Milch und des Humor aqueus, vermittelst der elektrometrischen Methode untersucht. Compt. rend. soc. biol. 59. 51. 1905; zitiert nach *Malys* Jahresbericht d. Tierchemie. 226. 1905.

van Dam hat mittelst der Bestimmung der elektromotorischen Kraft (Konzentrationskette[1]) den potentiellen Säuregrad (die Wasserstoffkonzentration) der Milch zu $0{\cdot}16-0{\cdot}32 \cdot 10^{-6}$ gefunden.

Der „konventionelle Wert" der Titration ist für die Praxis nicht zu unterschätzen. Man kann an ihm durch Vergleichsversuche unter Anwendung eines bestimmten Indikators den Gang der allmählichen Milchzersetzung studieren.

In Verbindung mit anderen Bestimmungen kann die Titration wertvolle Aufklärungen liefern.

Zur Ermittlung des Säuregehaltes der Milch wendet man am vorteilhaftesten die Methode von *Soxhlet-Henkel*[2]) an.

50 *cm*³ Milch tritriert man unter tüchtigem Schütteln gegen Phenolphtalein (2 *cm*³ einer 2%igen alkalischen Lösung) mit einer $\frac{n}{4}$ Natronlauge bis zu einer schwach-rötlichen Färbung. Die verbrauchten Kubikzentimeter Lauge mit 2 multipliziert geben die Azidität der Milch an (Säuregrad).

Thörner[3]) und andere variierten diese Methode, indem sie entweder weniger oder eine verdünnte Milch oder schließlich eine $\frac{n}{10}$ Natronlauge zum Titrieren gebrauchten.

Die Resultate dieser Methoden sind nicht alle gleich, was selbstverständlich ist, da z. B. durch die Verdünnung zwar der tatsächliche Gehalt der Säuren sich nicht ändert, aber bei dem Farbenumschlag der Indikatoren eine Verschiebung eintritt (*Michaelis* und *Rona*, *Friedenthal*[4]).

Man hält sich zweckmäßig bei Vergleichsbestimmungen an die eine Methode (*Soxhlet-Henkel*).

Frische Kuhmilch verbraucht im Mittel 6·8—7·5 *cm*³ $\frac{n}{4}$ Natronlauge.

Läßt man die Milch an der Luft stehen, so beginnt, wie schon erwähnt, allmählich eine bakterielle Zersetzung (Übergang von Milchzucker in Milchsäure), sie wird sauer und hat immer mehr Neigung zum Gerinnen.

Wird eine solche Milch erhitzt, so gerinnt sie. Darauf beruht die sogenannte Kochprobe.

Man erhitzt einige Kubikzentimeter Milch in einem Reagenzglas unter Umschütteln zum Sieden und überzeugt sich, ob sie geronnen ist.

Auch die Zugabe von Alkohol zur Milch wird als Kriterium dafür benutzt, ob diese schon zersetzt ist oder noch nicht.

Diese sogenannte Alkoholprobe wird ausgeführt, indem man gleiche Teile Milch und Alkohol (68 vol.-%ig) in einem Reagenzglas unter Um-

---

[1]) Siehe *Friedenthal*, Bd. 1. 553 der Arbeitsmethoden.

[2]) *Soxhlet* und *Henkel*, Titrationsapparat zur Bestimmung des Säuregehaltes der Milch nach neuer Methode, ref. Chem. Zentralbl. 229. 1887 und *Henkel*, Die Azidität der Milch, deren Beziehungen zur Gerinnung beim Kochen und mit Alkohol, die Säurebestimmungsmethode, der Verlauf der Säuerung. Milchwirtschaftl. Zentralbl. 3. 340. 1907.

[3]) *Thörner*, Zur Milchsäurebestimmung. Chem. Zeitung. 16. 1469. 1892.

[4]) Siehe Bd. 1 u. 3 dieses Handbuches.

schütteln mischt und feststellt, ob innerhalb einer Minute eine Gerinnung eintritt.

Außer der Milchsäuregärung findet in der sich zersetzenden Milch, durch anärobe Bakterien veranlaßt, die sogenannte Buttersäuregärung statt. Dabei entstehen flüchtige Fettsäuren, wie Buttersäure, Propionsäure, Essigsäure. (Übrigens entwickeln auch Milchsäurebildner gleichzeitig flüchtige Säuren in nicht geringer Menge.[1])

Um den qualitativen und quantitativen Verlauf der Bildung flüchtiger Säuren zu verfolgen, genügt die Bestimmung des Säuregrades nicht.

Man muß zur Destillation greifen, um im Destillate die flüchtigen Säuren isolieren und bestimmen zu können. Die bisher übliche Wasserdampf-Destillation ist nicht ganz zuverlässig. Denn abgesehen davon, daß auch Milchsäure mit Wasserdämpfen flüchtig ist, ist bei dieser Methode eine Hydrolysierung des Fettes und der Eiweißstoffe der Milch und dadurch ein Zerfall in flüchtige Säuren nicht zu umgehen.

Eine von *Welde* und vom Verfasser ausgearbeitete Methode[2], die auf der Verbindung der Wasserdampf- mit der Vakuumdestillation beruht (Vakuum-Dampfdestillation), gestattet die flüchtigen Fettsäuren ohne Gefahr der Eiweiß- und Fettzersetzung und getrennt von der Milchsäure zu bestimmen.

Hier wird nur ganz kurz die Methode angegeben; bezüglich der theoretischen Begründung und praktischen Ausführung sei auf die Originalarbeiten hingewiesen.

100 cm^3 Milch werden zunächst direkt 1 Stunde lang bei einer Wasserbadtemperatur von 60° destilliert. Dabei gehen die freien[3]) flüchtigen Fettsäuren über. Nach einer Stunde unterbricht man die Destillation, entleert die Vorlage und destilliert weiter. Die Destillate werden getrennt mit einer $\frac{n}{10}$ NaOH gegen Phenolphtalein titriert.

Diese getrennte Titration gestattet eine Kontrolle der Destillation. Das zweite Destillat darf höchstens $^1/_3$ des ersten an $\frac{n}{10}$ NaOH verbrauchen.

Will man auch die gebundenen flüchtigen Fettsäuren bestimmen, so destilliert man weitere zwei Stunden (je eine Stunde, etwa 700 cm^3 Destillat, wird titriert) unter Zusatz von 7—10 cm^3 Phosphorsäure (D = 1·12).

Die Milchsäure bleibt bei dieser Destillation im Rückstand. Ihre genaue quantitative Bestimmung ist noch nicht durchgeführt.

[1]) *Weigmann*, Mykologie der Milch. 44. 1911; *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chemie. 610. 1911.

[2]) *E. Welde*, Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung flüchtiger Fettsäuren. Bioch. Zeitschr. 28. 504. 1910. — *Bahrdt*, *Edelstein*, *Langstein*, *Welde*: Untersuchungen über Pathogenese der Verdauungsstörungen im Säuglingsalter. Zeitschr. f. Kinderheilkunde. 1. 139. 1910.

[3]) Und die aus ihren Salzen durch andere, nicht flüchtige Säuren (z. B. Milchsäure) freigemachten.

Schließlich vereinigt man alle Destillate und bestimmt durch Isolierung die Qualität und Quantität (Silbersalze) der Fettsäuren.[1])

Die Destillation von 250 *cm*³ frischer, roher Kuhmilch ergab:

$$0{\cdot}1\ cm^3\ \frac{n}{10}\ \mathrm{NaOH}\ \ldots\ldots\ \text{ohne}\ P_2O_5$$

$$0{\cdot}7\ cm^3\ \frac{n}{10}\ \mathrm{NaOH}\ \ldots\ldots\ \text{mit}\ P_2O_5$$

die Destillation von 250 *cm*³ frischer Frauenmilch $0{\cdot}12\ cm^3\ \frac{n}{10}$ NaOH.

Diese Methodik erhebt selbstverständlich keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die hygienische Seite der Untersuchung konnte nur ganz kurz gestreift werden. Bezüglich der bakteriologischen Prüfung der Milch muß auf Spezialwerke, die mehr in den Rahmen der Mykologie hineingehören, verwiesen werden.

Aus der Fülle der Methoden wurden nur solche ausgewählt, denen einerseits eine geschichtliche Bedeutung zukommt, die aber trotzdem in manchen Fällen gut anwendbar sind. Andrerseits sind nur ganz sichere in der Praxis erprobte Verfahren angegeben worden. Endlich ist auch die neueste Literatur berücksichtigt. Die ihr entnommenen Bestimmungsmethoden konnten auf ihre Richtigkeit noch nicht nachgeprüft werden und gelten wohl nur als Hinweis auf die Möglichkeit einer Verbesserung oder einer Vereinfachung der bisher bekannten Methoden.

Bei schnell orientierenden Analysen (für Milchhygieniker und Milchpraktiker) kommen folgende Bestimmungen in Betracht:

1. Spezifisches Gewicht mit dem Laktodensimeter nach *Soxhlet*.
2. Fett (nach *Gerber* am schnellsten und für Vollmilch genau genug).
3. Trockensubstanz: Handelt es sich um normale Kuhmilch, so ermittelt man die Trockensubstanz aus der *Fleischmann*schen Formel, in die man die gefundenen Werte von Fett und spezifischem Gewicht einsetzt. Sonst muß man durch Eindampfen die Trockensubstanz bestimmen, kombiniert aber zugleich diese Bestimmung mit der Ermittlung des Fettes. Dadurch fällt natürlich die erste Fettbestimmung weg. Man spart insofern an Material, indem man die in einem *Vogel*schen Schiffchen eingedampfte Milch bei 103° trocknet (im *Soxhlet*schen Trockenofen) und nach Feststellung der Trockensubstanz mit wasserfreiem Äther extrahiert und so das Fett bestimmt.
4. Säuregrad nach *Soxhlet-Henkel*.
5. Farbe, Geruch, Geschmack, Alkohol- und Kochprobe, Benzidinprobe.

Es ist selbstverständlich, daß sich daran eine Keimzählung der Milch, oft auch die bakteriologische Untersuchung anschließen muß.

Bei Analysen für Stoffwechsel und andere Versuche wird man bestimmen:

[1]) *Pringsheim*, Bd. 2 dieses Handb. und *Röhmann*, im Kapitel Fett, Bd. 2 dieses Handb.

1. Spezifisches Gewicht.
2. Fett nach *Gottlieb-Röse.*
3. Trockensubstanz.
4. Gesamtstickstoff nach *Kjeldahl.*
5. Gesamteiweißgehalt nach *Ritthausen.*
6. Das Filtrat davon (je 100 cm^3)[1]) wird für die Laktosebestimmung verwendet (Gewichtsanalytisch nach *Soxhlet*).
7. Kasein und Albumin nach *Hoppe-Seyler* oder für Frauenmilch nach der Modifikation von *Schmidt.*
8. Gesamtasche und Mineralanalyse.

Nimmt man für die Trockensubstanz 25 cm^3, so kann man damit auch die unter 8. aufgezählte Analyse bestimmen.

Insgesamt wird man mit 160—180 cm^3 Material auskommen.

Ergänzend sei noch darauf hingewiesen, daß die Milch keine homogene Lösung ist. Eine richtige Durchschnittsprobe ist infolgedessen für die Genauigkeit der Analysen eine primäre Forderung.

Für Stoffwechselversuche können Milchproben und verschiedene Milchmischungen in großen Molkereien gleichmäßig gemischt und sterilisiert werden.

So hergestellt, sind sie lange Zeit haltbar.

---

[1]) Und zwar das Filtrat ohne Waschwasser!

Fettbestimmung nach Kumagawa-Suto.

Von **Muneo Kumagawa**, Tokio.

1. Begründung unseres Verseifungsverfahrens als Fettbestimmungsmethode.

Wir bestimmen mit unserer Methode ausschließlich die Menge der hochmolekularen Fettsäuren im tierischen Material ohne Rücksicht darauf, welchen Verbindungen diese angehören. Unter den tierischen Bestandteilen ist gegenwärtig eine ganze Reihe von Verbindungen bekannt, welche im Moleküle Fettsäureradikale enthalten. Dahin gehören Neutralfett, Lezithin, Kuorin, Seife, Protagon, Zerebrin, Cholesterinester, Jekorin, Myelin, Lezithalbumin usw. Mit dem Fortschritte der Biochemie scheinen immer noch neue Zellenbestandteile entdeckt zu werden, die zur Gruppe der Phosphatide respektive der Lipoidsubstanzen gehören. Die meisten davon enthalten ebenfalls im Moleküle Fettsäureradikale. Nach unserer Methode werden nun alle genannten Verbindungen zunächst in ihre einzelne Komponenten zerlegt und hieraus wird die Gesamtmenge der hochmolekularen Fettsäuren quantitativ ermittelt. Im strengen Sinne ist demnach unser Verfahren keine Fettbestimmungsmethode, sondern ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der gesamten hochmolekularen Fettsäuren im tierischen Material. Fragt man indessen darnach, was man eigentlich mit den bisher bekannten Methoden bestimmt, so würde darauf keiner der Autoren eine klare Antwort geben können. Außer der Verseifungsmethode von *Liebermann-Székely* [1]) haben fast alle übrigen Fettbestimmungsmethoden das Ziel, aus dem Organpulver die in Äther respektive Petroläther löslichen Substanzen ad maximum auszuziehen. Das so gewonnene Extrakt bezeichnet man als Fett; allein es wird von dem einen oder anderen Extraktionsmittel viel zu viel verlangt, wenn es aus den unzähligen Verbindungen tierischen Materials nur Neutralfett oder Verbindungen mit Fettsäureradikalen (der Kürze halber Lipoidsubstanzen genannt), und zwar genau quantitativ ausziehen soll. Als natürliche Folge davon hat sich nach unseren Untersuchungen [2]) herausgestellt, daß alle diejenigen Methoden, welche sich besonders hoher Ausbeuten

[1]) *v. Liebermann* und *Székely*, Eine neue Methode der Fettbestimmung in Futtermitteln, Fleisch, Kot usw. Arch. f. d. ges. Physiol. **72**. 360 (1898).

[2]) *Kumagawa-Suto*, Fettbestimmung. Zeitschr. f. Bioch. 8. 212 (1908).

erfreuen, wie die Alkohol-Chloroformmethode von *G. Rosenfeld*[1], die Alkoholmethode von *E. Bogdanow*[2]) usw. Ätherextrakte liefern, die 17·4 bis 46% an Verunreinigungen einschließen. Trotzdem entgehen noch über 10% der hochmolekularen Fettsäuren der Bestimmung, indem dieselben im extrahierten Pulverrückstande zurückbleiben. Andere Methoden, welche allerdings viel feineres Fett mit ca. 5% Beimengungen liefern, wie die Methode der direkten Ätherextraktion von *Soxhlet*, von *E. Voit*[3]), diejenige der direkten Petrolätherextraktion von *W. Glikin*[4]) usw., vernachlässigen ebenfalls gegen 10% der hochmolekularen Fettsäuren. Die Verdauungsmethode von *Pflüger-Dormeyer*[5]), welche diesen Verlust zu vermeiden bezweckte, nimmt leider von neuem so beträchtliche Beimengungen auf, daß dieselben 16·7—40% des Ätherextraktes ausmachen. Trotzdem entgehen auch bei dieser Methode über 10% der Fettsäuren der Bestimmung. Diese Ergebnisse geben uns Beweisstücke dafür, daß alle diejenigen Methoden, welche Tierfett ohne Beimengung aus dem Organpulver quantitativ auszuziehen bezwecken, Unmögliches anstreben. Die Verseifungsmethode von *v. Liebermann-Székely*, die dem Prinzip nach unter den bisher bekannten Methoden der Fettbestimmung als die richtigste bezeichnet werden darf, leidet wiederum daran, daß sie eine viel zu große Menge niederer Fettsäuren mitbestimmt. Auch bei dieser Methode entgehen zudem noch etwa 9% der hochmolekularen Fettsäuren der Bestimmung.

Demnach gestatten uns keine der bisher gekannten Fettbestimmungsmethoden, aus dem tierischen Material das Neutralfett allein quantitativ zu isolieren. Umsoweniger sind wir imstande, die einzelnen Verbindungen mit Fettsäureradikalen getrennt zu bestimmen. Sollte es uns einstweilen auf irgend eine Weise gelingen, sämtliche Lipoidsubstanzen ohne Beimengung aus dem Organpulver quantitativ auszuziehen, so würde das so gewonnene Extrakt doch ein Gemenge von Verbindungen mit grundverschiedenen Molekulargrößen darstellen, das in keiner Hinsicht eine vergleichbare Einheit bildet und daher unmöglich einfach als Fett bezeichnet werden darf. Was für die genannten Verbindungen einzig gemeinsam ist, das sind nur die hochmolekularen Fettsäuren. Demnach bilden die letzteren allein für diese Gruppe von Verbindungen gemeinsame charakteristische Bausteine.

Zu den biologisch bedeutsamen Fragen muß zurzeit unzweifelhaft auch das Problem der Fettbildung aus Eiweiß im Tierkörper gezählt

---

[1]) *G. Rosenfeld*, Zur Methodik der Fettbestimmung. Zentr. f. inn. Med. **21**. Nr. 33. 833. (1900).

[2]) *E. Bogdanow*, Neue Methode der Fettbestimmung in tierischen Substanzen. Arch. f. d. ges. Physiol. **68**. 431. (1897.)

[3]) *E. Voit*, Ein Beitrag zur Methode der Fettbestimmung. Zeitschr. f. Biolog. **35**. 555. (1897.)

[4]) *W. Glikin*, Untersuchungen zur Methode der Fettbestimmung in tierischem Material. Arch. f. d. ges. Physiol. **94**. 107. (1903.)

[5]) *E. Pflüger*, Über die Entstehung von Fett aus Eiweiß im Körper der Tiere. Arch. f. d. ges. Physiologie. **51**. 277. (1892.) — *Dormeyer*, Die quantitative Bestimmung von Fetten, Seifen und Fettsäuren in tierischen Organen. Arch. f. d. ges. Physiologie. **65**. 90. (1897.)

werden. Zur Entscheidung dieser Frage ist gerade eine exakte Feststellung der hochmolekularen Fettsäuren allein maßgebend, wie unter anderem auch *F. Siegert* [1]) darüber folgendermaßen sich äußert: „Die fettige Degeneration der pathologischen Anatomen kann nur Bezug haben auf die Bildung wasserunlöslicher Fette oder Fettsäuren, nicht aber auf die Bildung der niedersten Fettsäuren, welche als solche und in ihren Glyzeriden noch mehr oder weniger wasserlöslich sind, ebensowenig auf Milchsäure und andere Oxysäuren, welche, obgleich ätherlöslich, doch an dem histologischen Bilde der fettigen Degeneration sicher keinen Anteil nehmen. Der Nachweis echter Fettbildung muß also hinauslaufen auf einen Nachweis der Entstehung hoher Fettsäuren, nicht etwa bloß einer Zunahme des Ätherextraktes." *F. Kraus* [2]) sagt darüber ebenfalls: „Die maßgebende chemische Leistung bei der Fettbildung im Organismus ist ausschließlich die Entstehung der höheren Fettsäuren."

Demnach steht es fest, daß die Entscheidung der Fettbildungsfrage aus Eiweiß im Organismus ohne einwandfreie Bestimmung sämtlicher hochmolekularen Fettsäuren ganz unmöglich ist. Leider sind alle bisherigen Untersuchungen, welche sich mit dieser Frage beschäftigt haben, mit mangelhaften Methoden angestellt worden. Daher bedürfen die bis jetzt gewonnenen Resultate betreffs genannter Fragen einer erneuten Revision mittelst einwandfreier Methoden.

Wenn wir somit vorschlagen, zur Fettbestimmung tierischen Materials die hochmolekularen Fettsäuren allein zu berücksichtigen, so wird dies jedem Unbefangenen im ersten Augenblicke etwas befremdend erscheinen, weil das tierische Neutralfett regelmäßig Triglyzeride hoher und niedriger Fettsäuren darstellt. Zieht man indessen die Zusammensetzung des Tierfettes etwas genauer in Betracht, so wird man leicht einsehen, daß unsere Auffassung durchaus begründet und zweckmäßig ist. Überblickt man in dem Werke der Fettchemie von *Benedikt-Ulzer* sowie im Buche von *Lewkowitsch* die sogenannten *Hehner*schen Zahlen, welche bekanntlich die Menge der wasserunlöslichen, also hochmolekularen Fettsäuren in 100 *g* Neutralfett angeben, so betragen diese bei Säugetieren im Mittel 95·7. Demnach besteht das Neutralfett der meisten Säugetiere zu 95·7% aus hochmolekularen Fettsäuren. Die fehlenden 4·3% gehören dem Glyzerin und den niederen Fettsäuren an. Die Menge der letzteren läßt sich aus der *Reichert-Meißl*schen Zahl leicht berechnen. Sie beträgt beim Säugetierfett im Mittel 0·765. Rechnet man sie auf Buttersäure um, so erhält man 0·135% des Neutralfettes. Ausgenommen Butterfett, einige Tranarten und Pflanzenöle, enthält also das Neutralfett flüchtige Fettsäuren in der Regel in einer so geringen Menge, daß man sie für die gewöhnliche Analyse ohne merklichen Fehler ganz vernachlässigen kann. Demnach halten wir es für

[1]) *F. Siegert*, Das Verhalten des Fettes bei der Autolyse der Leber. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 1. 114. (1901.)

[2]) *F. Kraus*, Über Fettdegeneration und Fettinfiltration. Verhdl. d. Deutsch. pathol. Ges. 1903. 45.

berechtigt und zweckmäßig, die fehlenden 4·3% ganz als Glyzerin in Anschlag zu bringen und den durch unsere Verseifungsmethode festgestellten Wert der hochmolekularen Fettsäuren aus praktischen Gründen durch Multiplikation mit dem Faktor 1·046 in Neutralfett anzugeben, obwohl tatsächlich ein nicht geringer Teil derselben in Form von anderen Lipoidsubstanzen oder Phosphatiden existiert.

In der Stoffwechsel- und Ernährungsphysiologie hat sich seit Jahrzehnten der Modus eingebürgert, die Menge der Eiweißkörper aus Stickstoff und die der Kohlenhydrate aus der Reduktionskraft zu berechnen, weil ihre quantitative Isolierung in den meisten Fällen fast unmöglich ist. Nur die Fettbestimmung wurde in dieser Hinsicht stiefmütterlich behandelt. Der tief eingewurzelte Irrtum, daß sich das Fett allein durch einfache Extraktion aus dem Organpulver genau quantitativ isolieren lasse, hat uns bis jetzt zu groben Fehlern Veranlassung gegeben. Dieser Irrtum ist um so auffälliger, als die indirekte Fettbestimmung von hochmolekularen Fettsäuren aus ihrer größeren Stabilität und ihres größeren Prozentgehaltes halber ungleich sicherer und genauerer ist, als die indirekte Bestimmung von Eiweißkörpern oder Kohlehydraten.

Demnach glauben wir wohl mit Recht, daß die quantitative Feststellung hochmolekularer Fettsäuren zurzeit unzweifelhaft die rationellste Fettbestimmungsmethode ist und unsere Verseifungsmethode für die quantitative Untersuchung der Lipoidsubstanzen unter allen Umständen die erste Grundlage bildet. Wenn hierzu noch in der Zukunft Methoden ausgearbeitet werden, welche uns gestatten, etwa, wie nach dem Vorgange von *A. Erlandsen*[1]), einzelne Phosphatide und sonstige Lipoidsubstanzen quantitativ zu isolieren, so würde man erst dann ein klares Bild erhalten, in welcher Verteilung sich die Fettsäureradikalen an dem Aufbau der Zellen beteiligen.

II. Beschreibung der Methoden.

Seit der Publikation unserer Verseifungsmethode haben wir bis jetzt öfters Gelegenheit gehabt, dieselbe in verschiedenen Fällen anzuwenden. Nach diesen Erfahrungen haben wir es für zweckmäßig gefunden, unsere Methoden in zwei Formen zu teilen:

1. Direkte Verseifung.
2. Alkoholextraktion mit nachfolgender Verseifung des Alkoholextraktes.

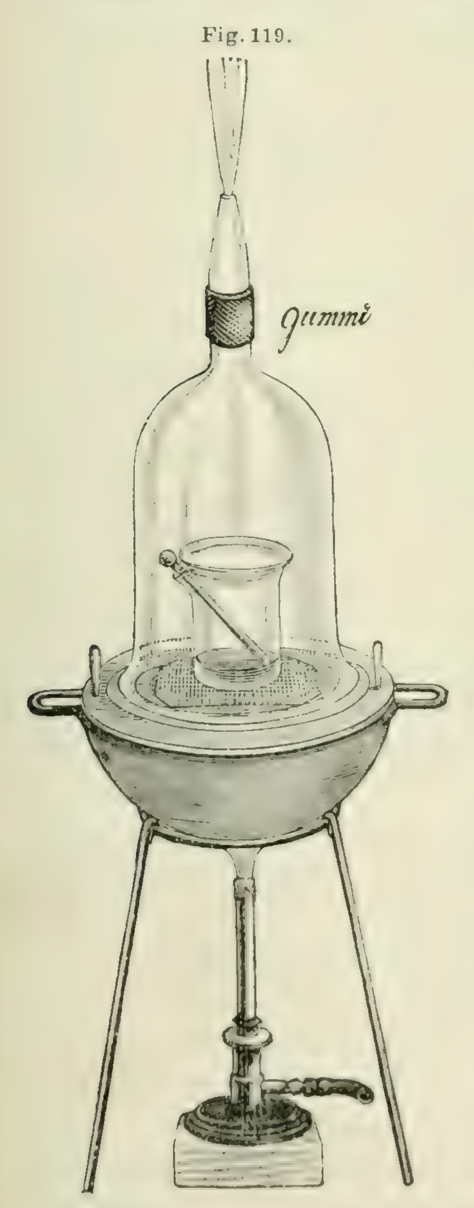
Hiervon ist indessen die direkte Verseifung weitaus in den meisten Fällen vorzuziehen. Sie stellt die Originalform dar, während die zweite als eine Modifikation der ersteren anzusehen und nur in den Fällen anzuwenden ist, wo die erstere nicht glatt zum Ziele führt. Daher brauche ich im Folgenden nur die erstere etwas genauer zu beschreiben. Die Ausführung der zweiten Methode ergibt sich dann meist ohne weiteres.

[1]) *A. Erlandsen*, Untersuchungen über die lezithinartigen Substanzen des Myokards und der quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. d. physiol. Chem. 51. 71. (1907.)

1. Direkte Verseifung.

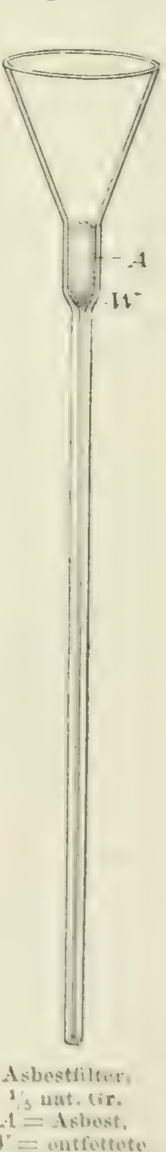
Je nach dem Umstande kann man das Material entweder in feuchtem Zustande oder in Pulverform verseifen. Nur muß man hier von Anfang an darauf achten, daß die Konzentration der Verseifungslauge in allen Fällen ungefähr dieselbe bleibt, damit die bei der folgenden Überneutralisation des Verseifungsgemisches mit Säure stets auftretende Ausscheidung sich ganz glatt und vollständig verdichtet. Wenn man Organbrei im feuchten Zustande verseift, nimmt man je nach dem Fettgehalt[1]) 5—20 *g* Substanz für eine Bestimmung und gibt hierzu ca. 7—8 cm^3 gesättigter Natronlauge (1·5 D — stets mit einem kleinen Meßzylinder abzumessen). Zu der Probe von ca. 5 *g* Brei setzt man außer Lauge noch etwa 14 cm^3 Wasser und zu derjenigen von ca. 10 *g* Brei entsprechend etwa 10 cm^3 Wasser hinzu usw. Über 20 *g* Brei ist kein Wasserzusatz mehr nötig. Handelt es sich um die Verseifung des getrockneten Organpulvers, so nimmt man je nach dem Fettgehalt 2—5 *g* desselben und gibt zweckmäßig 25 cm^3 fünffacher Normalnatronlauge (20 *g* NaHO in 100 cm^3) hinzu.

Fig. 119.



Dampfbad. 1/6 nat. Gr.

Fig. 120.



Asbestfilter. 1/5 nat. Gr. A = Asbest, W = entfettete Watte.

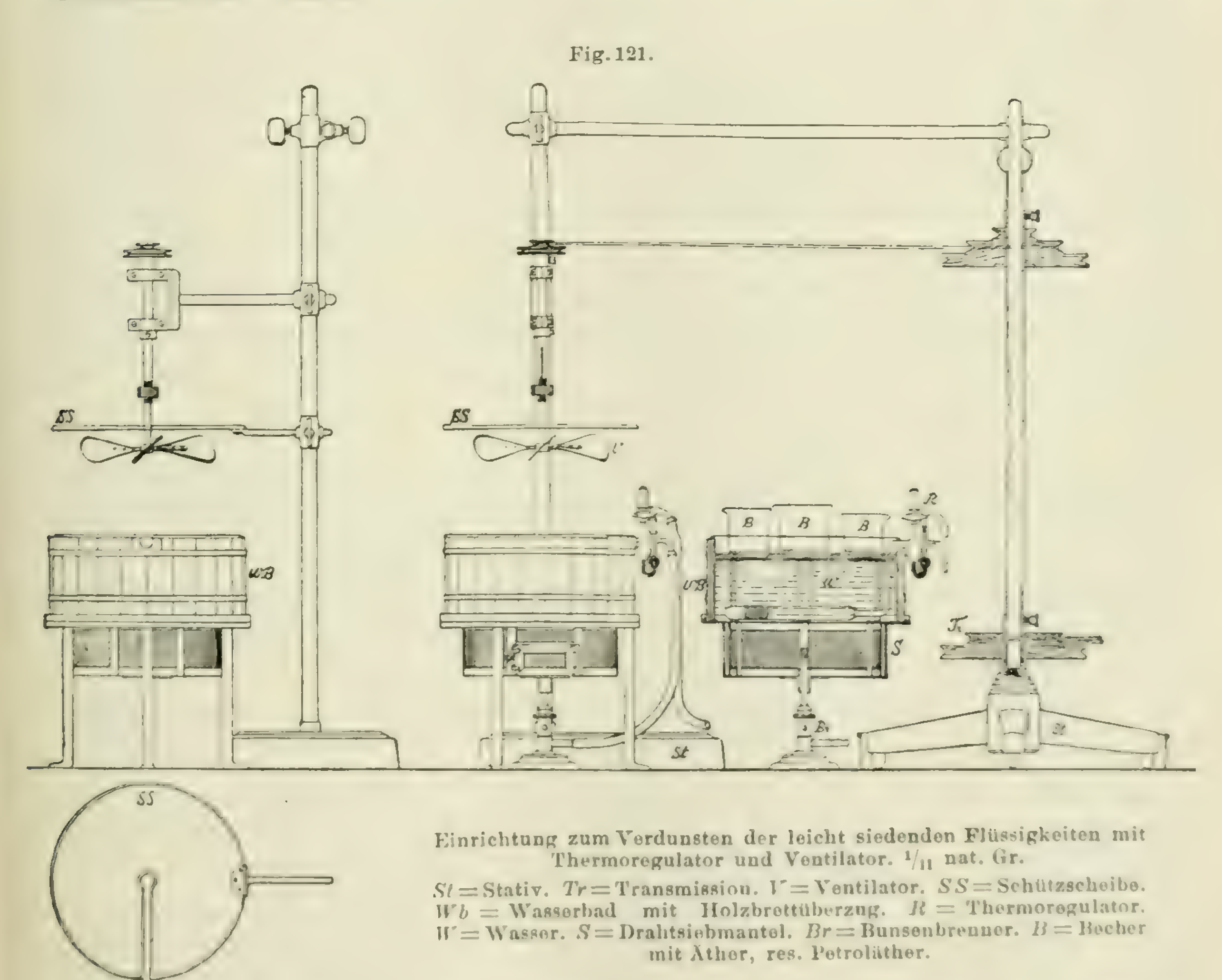
Die Verseifung geschieht nun in der Weise, daß die in einem Becherglas von 150 bis 200 cm^3 Rauminhalt mit Lauge versetzte Substanz auf dem Wasserbade zwei Stunden zerkocht wird. Zweckmäßig bedeckt man das Becherglas mit einer nach oben zu einer feinen Öffnung zugespitzten Glasglocke (Fig. 119). Die Temperatur steigt im Innern derselben überall auf 100° C. Während der Verseifung wird die Mischung ein paar Mal mit einem Glasstab umgerührt. Schon nach etwa 10 Minuten erfolgt eine gleichmäßige Auflösung der Sub-

[1]) Die zweckmäßige Menge hochmolekularer Fettsäuren, welche für eine Bestimmung in Wägung kommt, beträgt gegen 0·2—0·3 *g*.

stanz bis auf wenige Flocken. Nach etwa zweistündigem Zerkochen wird die Lösung noch warm in einen hermetisch schließenden Scheidetrichter von ca. 250 cm^3 Rauminhalt hineingebracht. Das Becherglas wird 2—3mal mit ein wenig warmem Wasser (etwa 5 cm^3) ausgespült. Nun wird die Mischung mit 30 cm^3 20%iger Salzsäure (1·1 D) überneutralisiert. Zu dem Zwecke werden am besten nach dem Erkalten des Trichters bis auf etwa 40—50° C zunächst 20 cm^3 der Säure hineingegossen, dann wird tüchtig geschüttelt und mittelst Leitungswassers gut abgekühlt. Alsdann werden die übrigen 10 cm^3 der Säure zugegeben und ganz ebenso weiter behandelt, wie vorher. Es tritt dabei eine reichliche Ausscheidung auf. Nach guter Kühlung werden nun 70—100 cm^3 Äthyläther hinzugegeben und tüchtig geschüttelt. Tennung erfolgt meist sofort. Der Niederschlag verdichtet sich hierbei zu einer dünnen Schicht in der Mitte. Die klare wässerige Schicht wird nach einigen Minuten abgegossen. Der bräunlich gefärbte Äther wird vorsichtig in ein Becherglas umgegossen. Der Trichter mit Niederschlag wird zweimal mit ein wenig Äther (5—10 cm^3) ausgespült. Der Niederschlag wird alsdann mit etwa 5 cm^3 Normalnatronlauge unter Umschütteln nochmals aufgelöst. Diese alkalische Lösung wird von neuem mit 30—50 cm^3 Äther tüchtig geschüttelt. Hierzu wird jene stark saure wässerige Lösung der ersteren Schüttelung hinzugebracht und nochmals gut geschüttelt. Die Reaktion wird hierbei sauer und die restierende Fettsäure geht hierbei quantitativ in den Äther über. Durch wiederholte Prüfung wurde festgestellt, daß sowohl in dem neu ausgeschiedenen ganz geringen Niederschlage wie auch in dem Schüttelwasser keine Spur Fettsäure mehr zurückbleibt. Der vereinigte Äther wird verdunstet, dann nochmals mit absolutem Äther aufgenommen, durch Asbestfilter (Fig. 120) abfiltriert und verdunstet (zum Verdunsten bedient man sich am zweckmäßigsten der Einrichtung Fig. 121). Das so dargestellte Ätherextrakt, das außer Fettsäuren Farbstoff, Milchsäure und noch unbekannte Beimengungen enthält, wird jetzt einige Stunden bei 50° C gut getrocknet und erst dann mit Petroläther extrahiert. Zu dem Zwecke gießt man am zweckmäßigsten auf das noch warme Ätherextrakt aus dem Trockenschrank sofort etwa 20—30 cm^3 Petroläther unter sanftem Umschwenken des Becherglases allmählich hinzu. Es tritt hierbei in der Regel eine milchige Trübung auf. Das Becherglas wird jetzt mit einem Uhrglas bedeckt ½—1 Stunde stehen gelassen, wobei der größte Teil der emulsionsartigen Ausscheidung sich harzartig zu Boden niederschlägt. Hierauf wird der Petroläther in ein vorher abgewogenes Becherglas von ca. 100 cm^3 Rauminhalt durch Asbest abfiltriert, das farblose Filtrat verdunstet und bei 50° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Diese wird nunmehr in kurzer Zeit erreicht. Eine genügende Trocknung des Ätherextraktes vor der Aufnahme desselben in Petroläther ist ganz besonders wichtig, um die Fettsäuren in reiner, farbloser Form zu erhalten. Hierzu ist auch die Vorsicht unerläßlich, daß sowohl der letzte Äthyläther wie der Petroläther absolut rein und trocken sind. Es ist eine bekannte Tatsache, daß hoch-

molekulare Fettsäuren beim Trocknen bei einer hohen Temperatur infolge der Oxydation mehr oder weniger eine Gewichtsveränderung zeigen. Wir haben indes durch wiederholte Extraversuche festgestellt, daß diese Gewichtsänderung bei 50° C und bei einer Trockendauer von einiger Stunden fast unmerklich ist, wenn die Fettsäuren rein genug sind. Daher haben wir vom umständlichen Verfahren der Trocknung in Kohlensäure- respektive Leuchtgasatmosphäre Abstand genommen. Vor jeder Wägung wurde indes das Becherglas mit Extrakt im evakuierten Exsikkator mit eingelegtem Chlorkalzium erkaltet.

Fig. 121.



Einrichtung zum Verdunsten der leicht siedenden Flüssigkeiten mit Thermoregulator und Ventilator. $^1/_{11}$ nat. Gr.

St = Stativ. *Tr* = Transmission. *V* = Ventilator. *SS* = Schützscheibe. *Wb* = Wasserbad mit Holzbrettüberzug. *R* = Thermoregulator. *W* = Wasser. *S* = Drahtsiebmantel. *Br* = Bunsenbrenner. *B* = Becher mit Äther, res. Petroläther.

Die so dargestellten Petrolätherextrakte enthalten stets etwas Cholesterin und eine noch unbekannte unverseifbare Substanz in ganz geringer Menge. Es ist deshalb nötig, die beiden letzteren von den Fettsäuren zu trennen.

Quantitative Trennung der unverseifbaren Substanzen (Cholesterin + X) von den Fettsäuren.

Dieses Verfahren stellt gleichzeitig eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins dar, weil die Menge der unbekannten Substanz in den meisten Fällen anscheinend sehr klein ist und dieselbe bei allen bisherigen Methoden der Cholesterinbestimmung stillschweigend auch mitbestimmt worden ist.

Das nach der Verseifung gewonnene Petrolätherextrakt wird nochmals in Petroläther aufgelöst, in einen Scheidetrichter hineingebracht und das Becherglas gut ausgespült, so daß der hierzu verwendete Petroläther im ganzen etwa 50—70 *cm*³ beträgt. Dazu wird $\frac{N}{5}$ absolut-alkoholische Kalilauge in einer solchen Menge hinzugegeben, daß diese einem etwa 30- bis 40fachen Volumen des ursprünglichen Petrolätherextraktes entspricht. Die Mischung wird einmal tüchtig geschüttelt. Es entsteht hierbei stets eine absolut klare Auflösung. Hierzu wird ebensoviel Wasser hinzugefügt, wie die zugesetzte Menge Kalilauge, und ein paar Mal geschüttelt. Indem hierdurch die Konzentration des Alkohols auf ungefähr 50% sinkt, erfolgt jetzt sofort eine glatte Trennung der oberen Petroläther- und der unteren Alkoholwasserschicht. Dabei bleiben die unverseifbaren Substanzen im Petroläther zurück, während die Seife in die untere Alkoholwasserschicht übergeht. Die abgetrennte alkoholische Seifenlösung wird noch einmal mit 30—50 *cm*³ neuen Petroläthers geschüttelt. Der vereinigte Petroläther wird verdunstet und der Rückstand durch die Nachbehandlung von der geringen Menge beigemengter Fettsäuren vollkommen befreit. Zu diesem Zwecke wird das Petrolätherextrakt nochmals in ein wenig absoluten Alkohol aufgelöst, jetzt mit 0·5—1·0 *cm*³ $\frac{N}{10}$ absolut-alkoholischer Natronlauge versetzt, wiederum auf dem Wasserbade verdunstet und 15—30 Minuten bei 100° C getrocknet. Der Rückstand wird noch heiß mit Petroläther extrahiert, durch Asbest abfiltriert, verdunstet und nunmehr bei 100° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das so dargestellte Extrakt stellt ein Gemenge von Cholesterin und noch unbekannter unverseifbarer Substanz dar, deren Trennung zurzeit uns noch nicht gelungen ist.

Wie im Eingange angeführt, ist nur ein Teil der von uns dargestellten Fettsäuren als Triglyzeride vorhanden. Die übrigen sind in verschiedenen Formen von Lipoidsubstanzen oder Phosphatiden verteilt. Will man indes die Gesamtmenge hochmolekularer Fettsäuren [1]) aus praktischen Gründen als Neutralfett angeben, so berechnet man, wie folgt:

[Petrolätherextrakt — (Cholesterin + X)] × 1·046 = Neutralfett.

Wie man sieht, ist die Ausführung der Methode sehr einfach. Man kann gleichzeitig mehrere Bestimmungen in kurzer Zeit ausführen. Unter den tierischen Bestandteilen durch direkte Verseifung mit gutem Erfolg auf ihren Fettsäuregehalt untersucht worden sind: Skelettmuskulatur, Herzmuskel, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Haut, Haut mit Haaren, Knochen, Magendarmstücke mit Schleimhaut, Lungen, Aszitesflüssigkeit, Pleuraerguß usw. [2]) Flüssigkeiten mit sehr geringem Fettgehalte werden zuerst bei alkalischer Reaktion auf eine passende Menge verdunstet und durch Zusatz

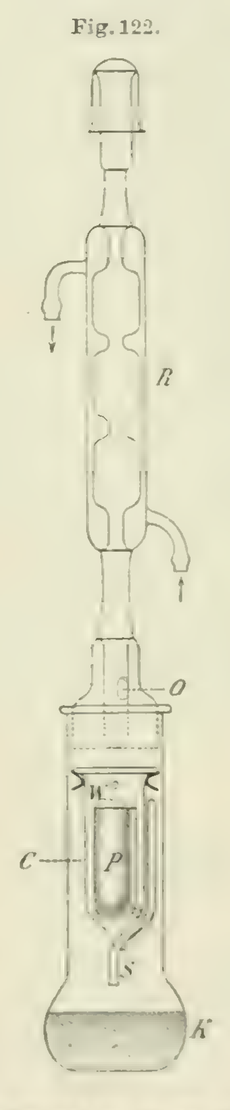
[1]) Die Reinheit der Petrolätherextrakte als hochmolekulare Fettsäuren wurde von uns durch Elementaranalyse festgestellt (siehe Originalabhandlung).

[2]) Die Untersuchungen hierüber hat *Y. Shimidzu* sowie *Kinji Watanabe* ausgeführt. Die Resultate darüber wird *R. Watanabe* demnächst berichten.

entsprechender Menge Lauge verseift. Von kleinen Tieren, wie Fröschen und Mäusen, lassen sich ganze Tiere in toto bequem und glatt verseifen.

Für direkte Verseifung weniger gute Resultate ergaben sich: Gehirnsubstanz, alle Bestandteile des Blutes, Fäzes und alle pflanzlichen Materialien mit Zellulose- und Stärkegehalt. Diese eignen sich insofern für die direkte Verseifung nicht, weil die bei der Überneutralisation des Verseifungsgemisches auftretende Ausscheidung sich nicht glatt verdichtet und dieselbe auf die Ätherextraktion störend einwirkt. Blutplasma und Blutserum lassen sich zwar ganz glatt verarbeiten, aber die Ausbeute der Fettsäuren ist nach *Shimidzu*scher Untersuchung aus unbekannten Ursachen stets bedeutend geringer als der wahre Wert. Alle genannten Substanzen lassen sich viel zweckmäßiger nach der folgenden Modifikation auf ihren Fettgehalt untersuchen.

Fig. 122.



Heißextraktor. 1/[illegible] nat. Gr.
R = Rückflußkühler.
K = Destillierkolben.
EC = Extraktionszylinder.
S = Siphon.
P = Papierhülse.
W = Entfettete Watte.
C = Einfacher Zylinder.
H = Drahthaken.

2. Alkoholextraktion mit nachfolgender Verseifung des Alkoholextraktes.

Handelt es sich um Flüssigkeiten wie Blut, defibriniertes Blut, Blutplasma, Blutserum oder um wasserhaltiges Material, wie Gehirnsubstanz, Fäzes u. dgl., so wird eine passende Menge [1]) derselben mit dem 3—5fachem Volumen absoluten Alkohols übergossen und über Nacht stehen gelassen. Dann wird die Mischung abgenutscht und ein paar Mal mit absolutem Alkohol ausgewaschen. Alsdann wird der Rückstand mittelst des von uns angegebenen Heizextraktors [2]) (Fig. 122) 3—5 Stunden mit absolutem Alkohol extrahiert. Die Erhitzung geschieht mit direkter Flamme, indem der Extraktor auf eine Eisenschale mit aufgelegtem Asbestpapier gestellt wird. Um das Stoßen zu vermeiden, wird die innere Fläche des Zylinderbodens mit Fluorwasserstoff rauh angeätzt. Nach der vollendeten Extraktion wird der innere Zylinder mit Substanz herausgenommen und das eingeengte Filtrat des zum Abnutschen und Auswaschen benutzten Alkohols in den äußeren Zylinder hineingebracht. Hierzu werden 7—8 cm^3 gesättigter Natronlauge (1·5 D) [3]) gegeben und jetzt auf dem Wasserbade mit aufgesetztem Rückflußkühler

[1]) Bei Blut 10—30 cm^3.

[2]) Die genauere Beschreibung des Apparates findet sich in der *Kumagawa-Suto*schen Abhandlung. Biochem. Zeitschr. 8. 212 (1908). — Der fast gleiche Extraktor wurde schon vor uns von Herrn *J. C. Berntrop* beschrieben. (Zeitschr. f. angew. Chem. 1902. S. 122). Diese Publikation haben wir damals leider nicht gekannt.

[3]) Die Menge der Natronlauge ist absichtlich im Überschuß gewählt.

½—1 Stunde verseift. Schließlich wird der Alkohol durch Entfernung des Kühlers verjagt, der Rückstand in wenig Wasser durch Erwärmen aufgelöst und in den Scheidetrichter hineingebracht. Die weitere Verarbeitung geschieht genau nach der oben beschriebenen Vorschrift bis auf die Cholesterintrennung.

In den mit Alkohol extrahierten Rückständen bleiben in der Regel Fettsäuren in so geringer Menge, daß sie für die gewöhnliche Analyse ohne nennenswerten Fehler ganz vernachlässigt werden können. Will man sie auch bestimmen, was bei genauer Fettbestimmung zur Kontrolle unerläßlich ist, so verseift man den Rückstand genau nach der Vorschrift der direkten Verseifung. Nur muß man nach der Verseifung des mit Alkohol extrahierten pflanzlichen Rückstandes die Überneutralisation im Becherglas selber vornehmen und das Amylum durch gründliche Zerkochung bei stark saurer Reaktion invertieren. Sonst erfolgt die nachfolgende Ätherextraktion nicht glatt. Wenn man übrigens diese Maßregel nicht versäumt, so kann man pflanzliches Material ohne viel Zellulosegehalt, wie Reis, von Anfang an nach der ersten Methode direkt verseifen. *R. Inaba*[1]) hat Reis, Gerste und Fäzes ebenfalls nach dieser direkten Methode mit Erfolg auf ihren Fettgehalt untersucht.

Handelt es sich um getrocknete Substanz, wie pflanzliche Mehlarten, so bleibt die vorherige Abnutschung mit Alkohol ganz weg, und die Substanz wird nach gründlicher Pulverisation sofort mittelst des Heizextraktors mit absolutem Alkohol extrahiert usw.

Bestimmung des Fettes im Harne (bei Chylurie).

Das Fett des chylurischen Harnes kann ebenfalls auf zweierlei Art bestimmt werden.

Als *K. Suto* etwa 50 *cm*³ des normalen Menschenharnes genau nach unserer direkten Verseifungsmethode verarbeitete, so resultierte stets eine kleine Menge von Petrolätherextrakt, das natürlich keine Fettsäure ist. Durch die Untersuchung von *Kanai Yamada* sowie von *Samuro Kakiuchi* hat sich bald herausgestellt, daß das Petrolätherextrakt des normalen Harnes nach der Verseifung nichts anderes ist als die aus der Hippursäure durch die Verseifung frei gewordene Benzoesäure, der etwas aromatische Oxysäuren und Phenole beigemengt sind. Um das Fett in dem chylurischen Harne zu bestimmen, muß man demnach aus dem Petrolätherextrakt diese Beimengungen eliminieren. Zu dem Zweck hat *S. Kakiuchi*[2]) eine modifizierte Methode ausgearbeitet. *Kakiuchi* stellte zunächst fest, daß der Gehalt des normalen Harnes an hochmolekularen Fettsäuren in Übereinstimmung mit *S. Hybbinette*[3]) in 10 *l* im Mittel

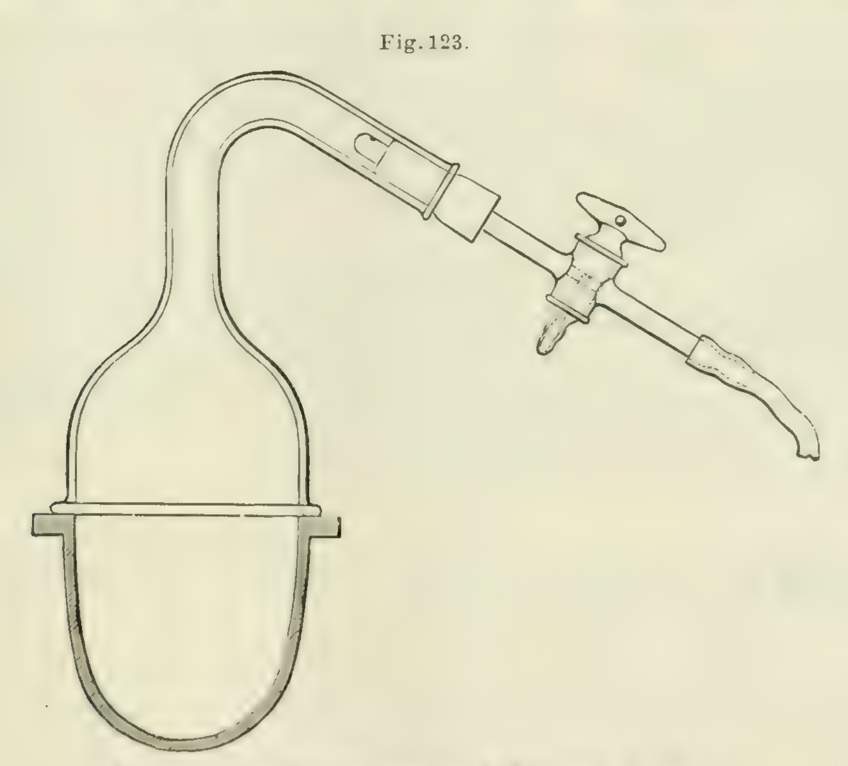
[1]) *R. Inaba*, Über die Fettbestimmungen der Fäzes und einiger Nahrungsmittel nach der neuen Methode von *Kumagawa-Suto*. Biochem. Zeitschr. 8. 348 (1908).

[2]) Hierüber wird *S. Kakiuchi* demnächst berichten.

[3]) *S. Hybbinette*, Über die Gegenwart von nichtflüchtigen fetten Säuren im normalen Menschenharne. Skand. Arch. VII. 380. 1897.

0·024 *g* beträgt und somit dieser Wert für die gewöhnliche Analyse ganz vernachlässigt werden darf. Nach *Kakiuchi* werden ca. 50 cm^3 chylurischen Harns durch Zusatz von 14 cm^3 gesättigter Natronlauge (1·5 D)[1]) verseift und weiter nach unserer Vorschrift verarbeitet. Alsdann wird das Petrolätherextrakt in einen Porzellantiegel oder in eine Platinschale von bekanntem Gewicht hineingebracht und im nebenverzeichneten Evakuationsapparat (Fig. 123) auf dem Wasserbade 3 Stunden durch die Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Hierdurch entweichen Benzoesäure nebst Oxysäuren und Phenolen vollständig. Nun wird der Behälter herausgenommen und nach dem Erkalten im Chlorkalziumexsikkator zurückgewogen. Daß sich die Benzoesäure hierbei vollständig verflüchtigt, wurde durch Extraversuche mit einem Gemenge von reiner Fettsäure und Benzoesäure festgestellt.

Fig. 123.



Vakuumverdampfungsapparat nach *Kakiuchi*. $^1/_4$ nat. Gr.

Nach einer zweiten Methode kann man den Fettgehalt des chylurischen Harns auf folgende Weise bestimmen. Der chylurische Harn enthält bekanntlich stets mehr oder weniger Eiweiß aufgelöst. Wird dieses unter Zusatz von Kochsalz und Essigsäure durch Aufkochen zur Koagulation gebracht, so reißt der Eiweißniederschlag quantitativ Fett mit. Dieser Niederschlag wird durch fettfreies Papier abfiltriert. Der Filter mit samt Niederschlag wird mittelst unseres Heizextraktors mit absolutem Alkohol extrahiert und alsdann das Extrakt nach unserer Vorschrift verseift usw.

Kakiuchi hat bei einem chylurischen Harne die beiden Methoden vergleichend durchprobiert und dabei fast vollständig übereinstimmende Re-

[1]) Zur Verseifung des Harns wird die Natronlauge wegen des Harnstoffgehaltes etwa in doppelter Menge versetzt wie sonst.

sultate erhalten. Im Besitze des Vakuumverdampfungsapparates führt die erstere Methode viel schneller und zweckmäßiger zum Ziele.

Fettverlust beim Trocknen wasserhaltigen Materials.

Alle bisherigen Fettbestimmungsmethoden konnten nicht anders als an getrockneten Pulvermassen angewendet werden. Man wußte deshalb nicht, ob der Fettgehalt des frischen Materials nach dem Trocknen und Pulverisieren auch unverändert bleibt. Da unsere Verseifungsmethode sich ebenso gut am frischen Material wie am getrockneten Pulver anwenden läßt, so hat *Y. Shimidzu* [1]) diese Frage besonders untersucht. *Shimidzu* hat dabei gefunden, daß der Fettverlust, wenn das Material in kleiner Menge (gegen 100 *g*) schnell getrocknet wird, nur einige Prozente beträgt, daß derselbe dagegen ca. 10% beträgt, wenn das Material in größerer Menge (gegen 400 *g*) verarbeitet wird und zum vollständigen Austrocknen desselben längere Zeit in Anspruch genommen wird. Da dieser Befund für Stoffwechselfragen und dergleichen große Tragweite besitzt und ferner *Shimidzu* gerade für große Fleischmassen nur wenig Trockenversuche ausgeführt hat, so hat *Munemichi Tamura* auf meine Veranlassung den Versuch auf etwas breiterer Basis von neuem in Angriff genommen. Obwohl diese Untersuchungen noch nicht abgeschlossen sind, und es daher verfrüht wäre, schon jetzt ein Urteil darüber zu äußern, so sei doch bemerkt, daß der Fettverlust beim Trocknen des frischen Materials nicht so bedeutend ist, wie ihn *Shimidzu* seinerzeit gefunden hat. *M. Tamura* wird nach dem Abschluß seiner Untersuchungen hierüber berichten.

[1]) *Y. Shimidzu,* Ein Beitrag zur *Kumagawa-Suto*schen Fettbestimmungsmethode. Biochem. Zeitschr. 28. 237 (1910).

Partielle Hydrolyse der Nukleinsäuren.

Von **P. A. Levene**, New-York.

Die Arbeitsmethoden bei der partiellen Hydrolyse haben sich nicht gleichmäßig auf alle Nukleinsäuren ausgedehnt. Es ist deswegen zweckmäßiger, die Methoden, wie sie sich am bequemsten für jede einzelne Nukleinsäure oder deren Bestandteile anwenden lassen, anzugeben.

Die Substanzen, welche seit dem Erscheinen des zweiten Bandes dieses Handbuches entdeckt wurden, sind die folgenden: 1. Phospho-d-ribonsäure (diese wird bei der Inosinsäure besprochen); 2. Zytidin; 3. Uridin; 3. Zytidin und Uridinphosphorsäure. (Die vier letzten Substanzen werden bei der Hefenukleinsäure besprochen.)

Außerdem ist die Tritikonukleinsäure untersucht worden.

Inosinsäure [1]:

$$\text{d-Ribosephosphorsäure: } O{=}P\begin{matrix}\diagup OH \\ -O-CH_2-(CHOH)_3\,COH. \\ \diagdown OH\end{matrix}$$

Die Methode zur Darstellung dieser Substanz hat sich verbessern lassen. Man kann nun das Baryumsalz ohne Schwierigkeiten in kristallinischer Form erhalten. Das Verfahren ist das folgende:

20·0 *g* inosinsaures Baryum werden mit 500 *cm*^{3} 1%iger Salzsäure gekocht. Nach dem Abkühlen wird Schwefelsäure bis auf 2% zugegeben. Dann werden das Hypoxanthin und die Salzsäure mittelst Silbersulfat entfernt. Das überschüssige Silber fällt man mit Schwefelwasserstoff und die Schwefelsäure durch Neutralisieren mittelst Baryumkarbonat. Es ist wichtig, das Baryumkarbonat frisch aus chemisch reinem Baryumhydrat zu bereiten.

Das Filtrat enthält weder Stickstoff noch freie Phosphorsäure. Es wird unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen eingeengt, wobei ein basisches Baryumsalz der gepaarten Phosphorsäure neben wenig Baryumkarbonat sich abscheidet. Das Ganze wird mittelst Essigsäure in Lösung gebracht und filtriert. Aus dieser Lösung wird das Baryumsalz mittelst absolutem

[1] *P. A. Levene* u. *W. A. Jacobs*, Über die Inosinsäure. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. Jahrg. 44. S. 746 (1911).

Alkohol als amorpher Niederschlag gefällt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Alkohol und Äther wird es getrocknet. Die Ausbeute beträgt 90% der Theorie. Um es kristallinisch zu erhalten, wird das Produkt fein gepulvert und mit 30 cm^3 Wasser versetzt. Beim Umrühren geht die klebrig gewordene Masse ziemlich rasch in Lösung. Aus dieser Lösung läßt sich das kristallinische Baryumsalz erhalten. Die Kristallisation wird beschleunigt durch Einimpfen und durch tüchtiges Reiben. Beim Stehen im Eisschrank bildet die Substanz am Boden des Gefäßes eine dicke Kristallschicht, die aus prachtvollen Aggregaten von sechseckigen Platten besteht. Die Mutterlauge enthält beträchtliche Mengen des Salzes. Wegen der leichten Bildung von basischem Salz ist es jedoch nicht empfehlenswert, die Mutterlauge zu konzentrieren. Zwecks Erhaltung des kristallinischen Salzes wiederholt man die Fällung mittelst Alkohol und verfährt weiter, wie bei der ersten Kristallisation.

Phospho-d-ribonsäure: $O = P \begin{matrix} \diagup OH \\ -O-CH_2(CHOH)_3\,COOH \\ \diagdown OH \end{matrix}$ läßt sich aus der d-Ribosephosphorsäure durch Oxydation mittelst Brom oder mittelst Salpetersäure erhalten.

Salpetersäureverfahren: 50·0 *g* inosinsaures Baryum werden zur Gewinnung der Ribosephosphorsäure hydrolysiert und das Ba-Salz der Substanz dargestellt. Dieses wird in Wasser gelöst und das Baryum quantitativ mittelst Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck zum Sirup verdampft. Dieser wird in 30 cm^3 Salpetersäure (sp. Gew. 1·2) gelöst und bei 40° C 24 Stunden stehen gelassen. Die Lösung wird dann in vier Teilen separat behandelt. Jeder Teil wird auf einem großen Uhrglas auf dem Wasserbade möglichst rasch unter stetem Umrühren zur Trockene verdampft. Auf diese Weise wird verhältnismäßig wenig Phosphorsäure abgespalten. Das Produkt wird dann in 2 Liter Wasser gelöst, mit ein paar Tropfen Phenolphtalein versetzt und sodann Kalkmilch bis zur neutralen Reaktion zugegeben. Die voluminöse Fällung von Kalziumphosphat wird abfiltriert und das Filtrat gekocht. Es bildet sich dabei ein Niederschlag. Die Mutterlauge wird auf 500 cm^3 konzentriert und weiter gekocht. Diese Behandlung wird mehrere Male wiederholt. Im Kalziumphosphatniederschlag werden beträchtliche Mengen der gesuchten Substanz mitgerissen. Um diese zurückzugewinnen wird das Kalziumphosphat in Wasser aufgeschwemmt und unter beständigem Turbinieren mit Essigsäure versetzt, bis der Niederschlag vollständig gelöst ist. Aus dieser Lösung wird die Phosphorsäure wieder mit Kalkmilch gefällt. Aus den vereinigten Mutterlaugen, die neben der Phosphorverbindung viel essigsaures Kalzium enthalten, wird die erstere nach dem Konzentrieren mittelst Bleiessig gefällt. Der Bleiniederschlag wird in Wasser aufgeschwemmt und mittelst Schwefelwasserstoffes zerlegt. Das Filtrat wird nach Abdunsten des Schwefelwasserstoffes, wie oben, mit Kalkwasser neutralisiert und aufgekocht und das Kalziumsalz, wie oben, gewonnen. Die Ausbeute beträgt 14 *g* oder 50% der Theorie.

Das Bromverfahren. 7·0 *g* ribosephosphorsaures Baryum werden in Wasser aufgeschwemmt und das Baryum quantitativ mittelst Schwefelsäure entfernt. Die Lösung wird dann auf 25 *cm*³ gebracht und dann mit 5 *g* essigsaurem Kalzium und 3 *g* Brom versetzt. Die Mischung wird geschüttelt, bis das Brom vollständig gelöst ist, und bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 24 Stunden ist das Brom fast verschwunden, und da die Lösung noch stark die Orzinprobe zeigt, werden noch 5 *g* essigsaures Kalzium und 3 *g* Brom zugesetzt. Nach zwei Tagen ist die Orzinprobe nur noch ganz schwach. Die Lösung wird erwärmt und das Brom mittelst Kohlensäure vertrieben. Sie wird mit Wasser verdünnt, mit Schwefelsäure auf Kongopapier angesäuert und dann mittelst Silbersulfat vom Brom befreit. Das Filtrat wird mittelst Schwefelwasserstoff vom Silber und dann von der Schwefelsäure quantitativ mittelst Baryt befreit. Das Filtrat wird auf ein kleines Volumen eingeengt. Die Lösung wird mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Der Niederschlag, der wegen Verunreinigung mit essigsaurem Kalzium von etwas gelatinöser Beschaffenheit ist, wird abgesaugt und mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Die weitere Reinigung der Substanz wird mittelst Bleiacetat wie bei dem oben angegebenen Verfahren ausgeführt.

Spaltung der Phospho-d-ribonsäure. 4·0 *g* Kalziumsalz werden in wenig Wasser und einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure gelöst und das Kalziumsulfat mittelst vier Volumen Alkohol gefällt. Es wird abgesaugt, das Filtrat mit Ammoniak neutralisiert und eingedampft und der Rückstand in 50 *cm*³ Wasser aufgenommen. Es wird dann 4 *cm*³ 25⁰/₀iges Ammoniak zugegeben und dann Eisessig, bis die Lösung auf Lackmus amphoter reagiert. Die Lösung wird im Einschlußrohr drei Stunden auf 130° erhitzt. Beim Steigen der Temperatur über diesen Grad ist man der Gefahr der Bildung von Brenzschleimsäure ausgesetzt. Die Lösung wird mit Wasser verdünnt und genau mittelst Bleiessig gefällt. Das Filtrat wird sorgfältig mittelst Bleiessig und Baryt gefällt und der Niederschlag abfiltriert. Dieser wird mittelst verdünnter Schwefelsäure zerlegt und die überschüssige Schwefelsäure mittelst Bleikarbonat abgestumpft. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt und das Filtrat eine Stunde mit Kadmiumkarbonat gekocht. Nach dem Filtrieren wird die Lösung auf dem Wasserbade zum Sirup eingedampft. Der Sirup wird mit ein wenig ribonsaurem Kadmium geimpft und der Kristallisation überlassen. Nach 24 Stunden erstarrt das Ganze. Es wird nun mit wenig Wasser verrührt und auf eine Nutsche gebracht. Die Ausbeute beträgt etwa 0·3 *g*. Zur Analyse wird die Substanz aus ganz wenig Wasser umkristallisiert.

Guanylsäure.[1])

In der Kenntnis dieser Säure ist kein wesentlicher Fortschritt gemacht worden. Dagegen ist es gelungen, das Guanosin in freiem Zustande

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über das Vorkommen des freien Guanosins in der Pankreasdrüse. Biochem. Zeitschr. Bd. 28. S. 127 (1910).

aus der Pankreasdrüse zu gewinnen. Das Verfahren war das folgende: Die Rohguanylsäure, welche direkt aus der Pankreasdrüse nach dem früher angegebenen Verfahren dargestellt ist, wird mittelst eines Überschusses von Ammoniak in heißem Wasser gelöst und auf einer Nutsche heiß in Alkohol filtriert. Es bildet sich dabei ein Niederschlag des Ammoniumsalzes der Guanylsäure; das Filtrat enthält das Guanosin. Wird das Filtrat bei vermindertem Druck eingedampft, so scheidet sich das Guanosin in langen prismatischen Nadeln ab. Zur Analyse braucht die Substanz nur einmal aus verdünntem (etwa 60%igem) Alkohol umkristallisiert zu werden.

Hefenukleinsäure.[1])

Die Bedingungen zur partiellen Hydrolyse dieser Säure haben sich mehrfach verbessern lassen. An dieser Stelle soll nur die Form angegeben werden, in welcher sie zuletzt ausgeführt wurde. Die Einzelheiten des Verfahrens sind nicht veröffentlicht und haben sich allmählich in den Arbeiten von *Levene*, *Jacobs* und *La Forge* entwickelt.

Partielle Hydrolyse. Diese wird am besten mittelst verdünntem Ammoniak ausgeführt. 100 *g* Nukleinsäure werden in einer Lösung von 80·0 *cm*³ Ammoniakwasser (sp. Gew. 0·90) und 420·0 *cm*³ Wasser aufgelöst und drei und eine halbe Stunden im Autoklaven erhitzt. Die Temperatur dieses Ölbades muß genau auf 170—175° C gehalten werden. Kleinere Quantitäten können im Einschmelzrohr hydrolysiert werden. Die Lösung wird in denselben Verhältnissen bereitet, jedoch das Rohr braucht nur auf 135° C erhitzt zu werden.

Trennung der einzelnen Fraktionen. Das Reaktionsprodukt läßt sich in drei Fraktionen teilen: die erste enthält das Rohguanosin; die zweite das Rohadenosin; die dritte das Zytidin und die Uridinfraktion.

Guanosinfraktion. Das Rohprodukt scheidet sich aus dem Produkte der Hydrolyse als gelatinöse Masse beim Abkühlen aus. Das Verfahren zur Gewinnung des reinen Guanosins hat sich nicht verändert. Da aber einige Forscher bei der Darstellung der Substanz Mißerfolg gehabt haben, so sollen die Einzelheiten des Verfahrens mit größerer Genauigkeit wieder angegeben werden. Es muß erwähnt werden, daß Guanosin sich nur dann in schönen Kristallen ausscheidet, wenn es von Verunreinigungen frei ist. Um mit Leichtigkeit Kristalle zu erhalten, müssen die folgenden Punkte beachtet werden.

Das Rohguanin wird in heißem Wasser gelöst und heiß mit Bleiessig gefällt, so lange ein Niederschlag entsteht. Die Mischung wird heiß filtriert und das Filtrat abwechselnd mit Ammoniak und Bleiessig versetzt. Es bildet sich dabei ein Niederschlag. Dieser wird abfiltriert, in heißem Wasser suspendiert, mittelst Essigsäure in Lösung gebracht und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Gemisch wird wieder aufgekocht, heiß filtriert und das Filtrat nur mäßig eingedampft. Das Guanin scheidet sich in

[1]) *P. A. Levene* und *W. A. Jacobs*, Über die Hefe-Nukleinsäure. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Jahrg. 43. S. 3150 (1910).

langen, tyrosinähnlichen Kristallen aus. Bei weiterem Eindampfen der Mutterlauge erhält man wieder die gelatinierende Substanz. Zur weiteren Reinigung wird die Substanz in heißem Wasser suspendiert und soviel Ammoniakwasser allmählich zugesetzt, bis das Guanosin sich löst. Die Lösung wird dann filtriert, beim Abkühlen scheidet sich das Guanosin in glänzenden Massen.

Vernin[1], $C_{10}H_{13}N_5O_5$. Bei dieser Gelegenheit soll auch das Verfahren zur Darstellung des Vernins angegeben werden. *E. Schulze* hat neulich bewiesen, daß das von ihm vor Jahren entdeckte Vernin mit dem Guanosin identisch ist. Man muß also im Vernin das zuerst aufgefundene freie Nukleosid anerkennen.

Wässerige Extrakte aus den auf Vernin zu untersuchenden Objekten werden, nachdem sie zuvor von den durch Bleiessig fällbaren Substanzen befreit worden sind, mit einer Merkurinitratlösung versetzt. Die durch dieses Reagens hervorgebrachten Niederschläge werden abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen, zwischen Fließpapier abgepreßt, dann mittelst Schwefelwasserstoff zersetzt. Die Filtrate vom Schwefelquecksilber werden, nachdem sie neutralisiert worden sind, auf ein geringes Volumen eingeengt; es wird Sorge dafür getragen, daß während des Eindunstens die Reaktion der Lösungen neutral bleibt. Aus den stark eingeengten Flüssigkeiten scheidet sich nach dem Erkalten das Vernin aus, und zwar in vielen Fällen anfangs als Gallerte; letztere lieferte dann nach dem Wiederauflösen in Wasser Kristalle. Der Merkurinitratniederschlag kann neben Vernin noch manche andere Substanzen enthalten, z. B. Asparagin, Glutamin, Arginin und Tyrosin. Wegen seiner Schwerlöslichkeit in Wasser läßt sich das Vernin leicht vom Asparagin, Glutamin und Arginin trennen. Aber auch seine Trennung von dem Tyrosin, das sich speziell in den bei Verarbeitung von Kürbiskeimpflanzen erhaltenen Merkurinitratniederschlägen in kleiner Menge vorfindet, bietet keine Schwierigkeit, denn das Vernin scheidet sich aus den bei Zerlegung jener Niederschläge erhaltenen Lösungen meistens vor dem Tyrosin aus. Gesetzt aber, daß anfangs das Vernin durch etwas Tyrosin verunreinigt ist, so kann man es davon befreien, indem man es in heißem Wasser löst und die beim Erkalten sich ausscheidenden Kristalle nach kurzer Zeit abfiltriert und zwischen Filtrierpapier abpreßt; das Tyrosin geht dann in die Mutterlauge über. Das in solcher Weise aus Kürbiskeimlingen dargestellte Vernin erweist sich nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Wasser als ganz frei von Tyrosin, wie aus seinem Verhalten gegen das *Millon*sche Reagens zu erkennen ist.

Xanthosin: $C_{10}H_{12}O_6N_4$ wird aus Guanosin bei der Behandlung mittelst salpetriger Säure erhalten. Es kristallisiert mit Kristallwasser und hat dann die Zusammensetzung $C_{10}H_{12}O_6N_4 + H_2O$. Das Drehungsvermögen ist $(\alpha)^{30}_{D} = 51{\cdot}21^0$ in ca. $8^0/_0$iger alkalischer Lösung. Es besitzt keinen scharfen Schmelzpunkt. Es wird nach folgendem Verfahren dargestellt.

[1] *E. Schulze*, Ein Beitrag zur Kenntnis des Vernins. *Hoppe-Seylers* Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. 66. S. 128 (1910).

16 *g* Guanosin werden mit einer Lösung von 25 *g* $NaNO_2$ in 75 cm^3 Wasser aufgekocht. Das Guanosin scheidet sich beim Abkühlen wieder als eine Gallerte aus, die mit einem Glasstab zerteilt wird. Es werden nun 25 cm^3 Eisessig zugegeben. Nun wird tüchtig durchgeschüttelt, bis alles Guanosin in Lösung gegangen ist und die heftige Stickstoffentwicklung aufgehört hat, was nach etwa 5 Minuten der Fall ist. Die Lösung wird nun mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und abgekühlt. Beim Reiben fängt alsbald die Kristallisation des Xanthosins an, das sich als gelbes, kristallinisches Pulver rasch am Boden des Gefäßes absetzt. Nach 24 Stunden wird es abfiltriert. Die Ausbeute beträgt 6 *g*. Durch Umkristallieren unter Anwendung von Tierkohle kann man es nicht von den gelben Beimengungen befreien. Zu diesem Zwecke wird es in heißem Wasser gelöst, noch heiß mit ein paar Tropfen Bleizucker versetzt und mit Schwefelwasserstoff behandelt. Nach dem Aufkochen wird das Schwefelblei abfiltriert und beim Erkalten scheidet sich dann das Xanthosin in farblosen, glänzenden, öfters zentimeterlangen Prismen ab. Es ist das schönste der Nukleoside. In kaltem Wasser ist es nur wenig löslich, leicht aber beim Erhitzen. In heißem, verdünntem Alkohol ist es auch löslich und kristallisiert beim Abkühlen bei längerem Stehen langsam in harten Warzen ohne Kristallwasser.

Adenosinfraktion. Das Filtrat vom Guanosin enthält außer dem Adenosin, Zytidin und Uridin noch phosphorhaltige Substanzen. Um diese zu entfernen, wird das Filtrat bei vermindertem Druck eingedampft, mit Ammoniakwasser deutlich alkalisch gemacht und mit 95%igem Alkohol so lange versetzt, als sich ein Niederschlag bildet.

Der Niederschlag besteht aus den phosphorhaltigen Substanzen. Das Filtrat enthält das Adenosin, Zytidin und Uridin. Das Adenosin wird als Pikrat isoliert. Zu diesem Zwecke wird die alkoholische Lösung bis zur Sirupkonsistenz eingedampft, mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion auf Lackmus versetzt und dann so lange mit Pikrinsäure behandelt, als sich ein Niederschlag bildet. Das freie Adenosin wird nach dem früher angegebenen Verfahren dargestellt.

Inosin aus Adenosin. Die Überführung des Adenosins in Inosin läßt sich auf folgende Weise bewerkstelligen.

5·0 *g* Adenosin werden in einer Lösung von 20 *g* $NaNO_2$ in 60 cm^3 Wasser heiß gelöst und die Lösung mit 20 cm^3 Eisessig versetzt. Es beginnt sofort eine lebhafte Stickstoffentwicklung. Nach einigen Stunden wird die Mischung in Eis gestellt und mit verdünnter Schwefelsäure so lange versetzt, bis sie auf Kongopapier schwach sauer reagiert. Die Lösung wird dann mit mehreren Volumen absoluten Alkohols versetzt und nach einigem Stehen in einer Kältemischung abgesaugt. Das Filtrat wird mit einigen Tropfen Ammoniak neutralisiert und zum Sirup eingedampft. Der Rückstand wird nochmals mit wenig Alkohol versetzt und wieder eingedampft. Er wird dann mit Essigsäureanhydrid übergossen und einige Minuten gekocht. Der Überschuß von Anhydrid wird abdestilliert und der Rückstand mit Chloroform ausgekocht. Nach 24stündigem Stehen im Eis-

schrank wird von anorganischen Salzen abfiltriert und das Chloroform abgedunstet. Alle diese Operationen sollen bei möglichst neutraler Reaktion vorgenommen werden, um Hydrolyse des Ribosids zu vermeiden. Auf diese Weise wird das entstandene Inosin in ein Azetylderivat übergeführt. Ohne dieses zu isolieren, kocht man den Rückstand mit einem Überschuß einer verdünnten Barytlösung eine halbe Stunde. Das Baryum wird mit einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure gefällt und die Lösung dann, um kleine Mengen aus dem Chloroform entstandener Salzsäure zu entfernen, mit wenig Silbersulfat versetzt. Das Filtrat wird mit Schwefelwasserstoff behandelt, der Überschuß des letzteren vertrieben und das Filtrat mit reinem Bleiessig genau gefällt. Das Inosin kann nun mittelst Blei und Ammoniak gefällt werden.

Zytidin und Uridinfraktion. Das Filtrat vom Adenosinpikrat ist nicht ganz von Nukleosiden frei. Um diese zu entfernen wird die Lösung mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 2°/₀ versetzt und dann zwei Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Die Pikrinsäure wird dann mittelst Äther ausgeschüttelt. Die freien Purinbasen werden dann mit einer Lösung von Merkurisulfat in 5°/₀iger Schwefelsäure gefällt. Nach dem Zusatz dieses Reagenses wird die Mischung über Nacht stehen gelassen. Das Filtrat vom Niederschlage wird vom Quecksilber und von Schwefelsäure befreit, auf ein kleines Volumen eingedampft und dann mit einer konzentrierten Lösung von Pikrinsäure versetzt, bis die Lösung zu opaleszieren anfängt. Es ist ratsam, sie dann bei vermindertem Druck auf ein kleines Volumen einzudampfen und im Eisschrank über Nacht stehen zu lassen; es scheidet sich dann das Zytidinpikrat aus.

Zytidin: $C_9H_{13}N_3O_6$.

Zytidinpikrat: $C_9H_{13}N_3O_5\,C_6H_2(NO_2)_3OH$ läßt sich aus dem Rohprodukte durch Umkristallisieren aus Alkohol erhalten. Das Rohprodukt wird in wenig kochendem absolutem Alkohol gelöst und die Lösung über Nacht im Eisschrank stehen gelassen. Schmelzpunkt = 185—187° C (unkorr.).

Zytidinsulfat: $(C_9H_{13}N_3O_5)_2\,H_2SO_4$. Es wird aus dem Pikrate dargestellt. Das Pikrat wird in heißem Wasser gelöst und die heiße Lösung mit Toluol ausgeschüttelt. Sobald die Lösung sich allmählich abzukühlen beginnt, wird sie mit Schwefelsäure bis zu saurer Reaktion auf Kongo versetzt und die Pikrinsäure weiter mit Äther entfernt. Nach dem Entfernen der Schwefelsäure wird die Lösung bei vermindertem Druck auf ein ganz kleines Volumen eingedampft, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Alkohol versetzt, bis die Lösung zu opaleszieren beginnt. In kurzer Zeit scheidet sich das Sulfat in langen prismatischen Nadeln aus. Schmelzpunkt = 233° C. — $[\alpha]$[1]$^{20}_{D} = +34{\cdot}0^{\circ}$.

Zytidinchlorhydrat: $C_9H_{13}N_3O_5 \,.\, HCl$ läßt sich auf ähnlicher Weise, wie das Sulfat, erhalten. Schmelzpunkt = 218° C (unkorr.).

[1]) Die Angabe von 29·7° C beruht auf einem Berechnungsfehler; die Messung war dann bei 1° = 30° C ausgeführt.

Tribenzoylzytidin: $C_9H_{10}N_3O_5(C_6H_5CO)_3$ wird nach der Methode von *Schotten-Baumann* aus irgend welchem anderen Salze erhalten. Schmelzpunkt = 205° C (unkorr.).

Uridin: $C_9H_{12}N_2O_6$.

Uridin kann aus Zytidin durch Einwirkenlassen von salpetriger Säure erhalten werden. Die Darstellung wird auf folgende Weise ausgeführt:

10 *g* Zytidin werden in 70·0 *cm*³ Wasser gelöst, in die Lösung 30 *g* Kaliumnitrit eingetragen und der Lösung 50 *cm*³ Eisessig zugegeben. Es beginnt sofort eine lebhafte Entwicklung von Stickstoff. Nach 5 Stunden ist die Reaktion vollständig beendigt. Die Lösung wird wieder etwas verdünnt, mit 50%iger Kalilauge zuerst neutralisiert und dann mit derselben Lösung bis zu einem Gehalt von 10% der Lauge gebracht. Diese Lösung wird hierauf mit Benzoylchlorid benzoyliert. Das erhaltene Benzoylderivat ist unlöslich in Wasser, leicht löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln und kann nicht in gut kristallinischer Form erhalten werden; es wird deshalb verseift, um die freie Substanz zu erhalten. Zu diesem Zwecke wird das Benzoylderivat in 140·0 *cm*³ Alkohol gelöst, zur alkoholischen Lösung eine Lösung von 36·0 *g* Barythydrat in 800 *cm*³ Wasser zugegeben und das Gemisch 1 Stunde am Rückflußkühler gekocht. Das Reaktionsprodukt wird dann mit Schwefelsäure vom Baryt und vom größten Teile der Benzoesäure befreit; die noch in Lösung gebliebene Benzoesäure wird mit Äther ausgezogen. Um das anhaftende Natriumchlorid zu entfernen, wird das Reaktionsprodukt nach dem Ausziehen mit Äther mit Silbersulfat behandelt. Das Filtrat vom Silberchlorid wird vom überschüssigen Silber und dann von der Schwefelsäure mittelst Barytwasser befreit. Auch nach allen diesen Behandlungen enthält die Lösung außer dem Uridin noch kleine Mengen von Verunreinigungen; um diese zu entfernen, wird das Uridin mittelst Bleizuckerlösung und Barythydratlösung gefällt. Der Niederschlag wird dann vom Blei mit einem Überschuß von Schwefelsäure und von dieser quantitativ mit Barytlösung befreit. Die auf diese Weise erhaltene Lösung wird bei vermindertem Druck bis zu einem ganz kleinen Volumen eingedampft, in einer Schale in den Vakuumexsikkator gebracht und bis zur Konsistenz eines Sirups eingeengt. Der sirupartige Rückstand wird dann mit absolutem Alkohol gut umgerührt, bis die Substanz auskristallisiert. Aus verdünntem Alkohol umkristallisiert, scheidet sich das Uridin in langen prismatischen Nadeln aus. Schmelzpunkt 165° C (unkorr.). $[\alpha]_D^{20} = + 6{\cdot}38°$ in ca. 9%iger wässeriger Lösung.

Die Darstellung aus der Nukleinsäure wird bei der Besprechung der Zytidin- und Uridinphosphorsäure angegeben.

Zytidin- und Uridinphosphorsäure:

$$O = P{\begin{matrix}\diagup OH \\ -O\,.\,C_9H_{12}N_3O_4 \\ \diagdown OH\end{matrix}} \quad \text{und} \quad O = P{\begin{matrix}\diagup OH \\ -O\,.\,C_9H_{11}N_2O_5 \\ \diagdown OH\end{matrix}}.$$

Die Darstellung der Pyrimidinnukleotide beruht auf der größeren Resistenz dieser Komplexe im Vergleich mit den Purinkomplexen gegenüber der Einwirkung der Mineralsäuren. Während die Purinkomplexe durch zweistündiges Erhitzen mittelst 2%iger Schwefelsäure vollkommene Aufspaltung in Phosphorsäureribose und Base erleiden, bleiben die Pyrimidinkomplexe bei dieser Behandlung größtenteils intakt. Die Gewinnung der Substanz wird nun auf folgende Weise ausgeführt: Je 100 *g* der Nukleinsäure werden in 1 *l* 2%iger Schwefelsäure 2 Stunden am Rückflußkühler im Ölbade bei 125° C gekocht. Die Flüssigkeit wird nur teilweise gekühlt und mit reinem Silberoxyd bis zu einem Überschuß an Silber versetzt. Die Silbersalze der Purinbasen scheiden sich dabei aus. Um die Fällung zu vervollständigen, läßt man das Gemisch über Nacht stehen und entfernt die Silberpurine durch Filtration. Das Filtrat neutralisiert man mit chemisch reiner Barytlösung. Es scheiden sich dadurch die Silbersalze der Nukleotide mit Silberphosphat aus. Der Niederschlag wird in Schwefelsäure gelöst und mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreit. Das Filtrat vom Silbersulfid wird mit Barytlösung genau auf Phenolphtalein neutralisiert, vom Barytphosphat abfiltriert und bei vermindertem Druck fast bis zur Trockne eingedampft. Ein Teil der Salze geht dabei in eine in Wasser unlösliche Form über. Das Gemisch wird mittelst Essigsäure in Lösung gebracht und die Lösung in absoluten Alkohol eingetragen. Die Baryumsalze der Nukleotide scheiden sich dabei aus. Dieses Rohprodukt ist schon vollständig frei von Nukleinsäure oder von Purin enthaltenden Komplexen. Beim Arbeiten mit der Hefenukleinsäure läßt sich das schon daran leicht erkennen, daß die Purinkomplexe eine starke Orzinprobe geben und nach kurzer Hydrolyse mittelst Mineralsäure *Fehling*sche Lösung reduzieren Dagegen geben die Barytsalze der Pyrimidinnukleotide nur eine ganz schwache Orzinprobe, nach Hydrolyse mittelst Mineralsäuren geben sie mit Silbernitrat keinen Niederschlag der Purinsalze und auch keine Spur einer Reduktion der *Fehling*schen Lösung. Die Substanzen sind optisch aktiv, rechtsdrehend. Sie unterscheiden sich von Purinnukleotiden auch dadurch, daß sie durch Nukleasen nicht angegriffen werden.

Hydrolyse mit verdünntem Ammoniak.

Zur Gewinnung der Pyrimidinkomplexe des Zytidins und Uridins aus den Nukleotiden wird auf folgender Weise verfahren.

Die Lösung der Baryumsalze wird quantitativ von Baryum befreit. Die resultierende Lösung reagiert stark sauer. Deswegen wird sie mit wässerigem Ammoniak neutralisiert und dann mit einem Überschuß von Ammoniak bis zu einem Gehalt von 3% versetzt. Die ammoniakalische Lösung wird entweder im Einschmelzrohre bei 135° C oder im Autoklaven bei der Temperatur des Ölbades von 175° C 3½ Stunden erhitzt. Die Isolierung der Pyrimidinkomplexe beruht auf ihrer Löslichkeit in Alkohol. Zum Zwecke der Isolierung wird das Hydrolyseprodukt bei vermindertem Druck bis zur Konsistenz eines Sirups eingedampft und der Rückstand mit Al-

kohol extrahiert. Der alkoholische Auszug wird bei vermindertem Druck eingedampft, der Rückstand wieder mit Alkohol extrahiert und eingedampft. Von diesem Punkte an kann man auf verschiedene Weisen verfahren. Der Rückstand, welcher nach dem Eindampfen des alkoholischen Auszuges entsteht, wird mit Salpetersäure bis zu saurer Reaktion von Kongo versetzt. Die Lösung wird in einer Kältemischung aufbewahrt. Das salpetersaure Salz des Zytidins scheidet sich sofort aus. Um die Reaktion zu vervollständigen, wird der Mischung ein halbes Volumen Alkohol zugegeben.

Im Filtrat bleibt das Uridin in Lösung und kann als Benzoylderivat erhalten werden. Das Filtrat vom salpetersauren Zytidin wird bei Zimmertemperatur im Vakuum-Exsikkator von Alkohol befreit und der Rückstand nach *Schotten-Baumann* benzoyliert. Es wird auf diese Weise das Dibenzoyluridin erhalten.

Das zweite Verfahren wird auf folgende Weise ausgeführt: Der alkoholische Auszug, welcher die Pyrimidinkomplexe enthält, wird von Alkohol befreit und mit Pikrinsäure behandelt, die Lösung auf ein ganz kleines Volumen bei vermindertem Druck eingedampft und bei — 1·0° C stehen gelassen. Es scheidet sich Zytidinpikrat aus. Dieses wird zur Reinigung aus Alkohol umkristallisiert. Die Ausbeute aus 50 *g* der Baryumsalze der Nukleotide beträgt 10 *g*. Die Mutterlauge von Zytidinpikrat wird mittelst Schwefelsäure und Äther von Pikrinsäure befreit und die Schwefelsäure quantitativ mit Barytlösung entfernt. Aus dieser Lösung läßt sich das Uridin durch Fällen mit Bleiazetat und Baryt gewinnen. Zu diesem Zwecke wird die Lösung mittelst basischem Bleiazetat gefällt, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit Barytlösung versetzt. Der Niederschlag wird vom Blei mittelst Schwefelsäure und von dieser quantitativ mittelst Barytlösung befreit. Man erhält dabei eine klare Lösung. Diese wird bei vermindertem Druck eingedampft und der Rückstand in 95%igem Alkohol aufgenommen. Der alkoholische Auszug wird rasch auf dem Wasserbade eingedampft. Es ist ratsam, den Rückstand einige Male in Alkohol zu lösen und einzudampfen, um ihn möglichst von Wasser zu befreien. Beim Impfen mit ganz wenig Uridin erstarrt der Rückstand zu einer krystallinischen Masse. Diese läßt sich leicht aus 95%igem Alkohol umkristallisieren.

Tritikonukleinsäure.[1])

Aus der Tritikonukleinsäure werden Guanosin, Adenosin und Zytidin auf dieselbe Weise, wie aus der Hefenukleinsäure, erhalten. Abgeändert worden ist nur das Verfahren zur Darstellung der Nukleinsäure.

Darstellung: 23 *kg* Mehl aus Weizenembryonen werden mit 200 *l* Wasser gut durchgerührt, das Extrakt durch ein Tuch geseiht und 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen. Die trübe Flüssigkeit wird dann vom Absatz abgegossen und nach Zugabe von 1 *l* 10%iger Salzsäure

[1]) *P. A. Levene* und *F. B. La Forge*, Über die Tritikonukleinsäure. Ber. der Deutsch. chem. Ges. Jahrg. 43. 3164 (1910).

mit einer Lösung von 30 *g* Pepsin versetzt. Nach 36stündigem Stehen bei gewöhnlicher Temperatur wird die Flüssigkeit vom ungelösten Nuklein abgegossen und dieses mit etwa 50 *l* 0·2%iger Salzsäure aufgeschlemmt und noch einmal 24 Stunden mit Pepsin der Verdauung unterworfen.

Nach dem Auswaschen wird das Nuklein in ca. 30 *l* Wasser aufgeschlemmt und soviel Kalilauge zugegeben, bis fast vollständige Lösung eintritt und die Flüssigkeit alkalisch reagiert. Dann wird mit einer gesättigten Pikrinsäurelösung das Eiweiß ausgefällt. Das Filtrat liefert bei Zugabe von Salzsäure einen flockigen Niederschlag, der sich bald zu einer festen Masse zusammenballt. Die so erhaltene rohe Nukleinsäure wird in einem kleinen Überschuß von Kalilauge gelöst, nach dem Filtrieren mit Essigsäure angesäuert und durch Eingießen in das zehnfache Volumen Alkohol gefällt.

Nach dem Absetzen wird der verdünnte Alkohol vom Niederschlag abgegossen und dieser unter starkem Alkohol 24 Stunden stehen gelassen. Dann wird er abfiltriert und mehrmals mit absolutem Alkohol und schließlich mit Äther gewaschen und über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet.

Die Ausbeute beträgt 325 *g*.

Zur weiteren Reinigung wird die Substanz in wenig Ammoniakwasser gelöst und in einen großen Überschuß (für 100 *g* 10 *l*) von Eisessig gegossen. Nach dem Absetzen wird auf der Nutsche filtriert und mit Alkohol und Äther gewaschen.

Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration durch Gasketten.

Von **Leonor Michaelis**, Berlin.

1. **Die Nernstsche Formel.** Wenn ein Metall in irgend eine Flüssigkeit taucht, so nimmt es gegen dieselbe ein elektrisches Potential an. Zum Verständnis des Folgenden ist es notwendig, die *Nernst*sche Theorie dieser Kontaktelektrizität wenigstens im Groben sich klar zu machen. Bei dieser Theorie wird dem Metall die Fähigkeit zugeschrieben, mit positiver Elektrizität geladene Atome, die sogenannten Ionen, in die Lösung zu senden, indem die Metallplatte selbst, mit freier negativer Elektrizität geladen, zurückbleibt. Umgekehrt haben Ionen dieses Metalls, welche etwa in der Flüssigkeit schon gelöst vorhanden sind, das Bestreben, sich als unelektrisches Metallatom auf der metallischen Oberfläche niederzuschlagen, indem sie die positive Elektrizität auf der Metalloberfläche in Freiheit setzen oder mit anderen Worten die Metallplatte positiv aufladen. Es steht sich also der „elektrolytische Lösungsdruck" des Metalls und der „Entladungsdruck" der gelösten Ionen einander gegenüber. Und aus diesen beiden Kräften resultiert im Einzelfall das wirkliche Potential. Der elektrolytische Lösungsdruck eines jeden Metalles ist eine konstante Größe; der Entladungsdruck der Ionen dagegen ist proportional ihrem osmotischen Druck in der Lösung oder, so weit es sich um verdünnte Lösungen handelt, ihrer Konzentration. Daraus folgt die für unsere Methodik wichtige Grundtatsache, daß das Potential eines Metalles gegen eine Flüssigkeit nur von der K o n z e n t r a t i o n der in der Lösung befindlichen I o n e n des g l e i c h e n Metalls abhängt, und daß andrerseits aus dem Potential ein Schluß auf die Konzentration dieser Ionen gezogen werden kann. Alle anderen Ionenarten, die sich etwa daneben noch in Lösung befinden, wirken nicht bestimmend auf das Potential.

Die Größe dieses Potentials ist also abhängig 1. von der Natur des Metalles, 2. von der Natur des Lösungsmittels, 3. von der Konzentration der in der Flüssigkeit gelösten Ionen dieses Metalles, 4. von der Temperatur. Die Größe des elektrischen Potentials E wird nach *Nernst* durch folgende Gleichung ausgedrückt:

$$E = RT \text{ log. nat. } \frac{P}{c} .$$

Hier bedeutet R die „Gaskonstante“, T die absolute Temperatur, γ die für das betreffende Metall charakteristische Konstante, c die Konzentration der in der Flüssigkeit gelöst enthaltenen Ionen desselben Metalles. Die Konzentration wird nach Grammolen pro Liter gemessen. Verwandelt man den natürlichen Logarithmus der Bequemlichkeit halber in den dekadischen durch Multiplikation mit dem Modulus 0·4343, so ergibt sich

$$E = RT \,.\, 0{\cdot}4343 \,.\, {}^{10}\log \frac{\gamma}{c}.$$

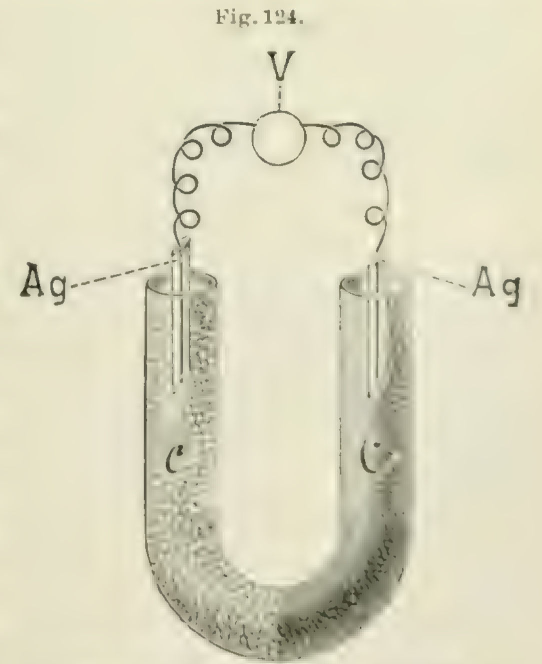
In elektrochemischem Maße ist nun 0·4343 . R = 0·0001983 Einheiten. Daher ergibt sich schließlich

$$(1) \qquad E = 0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, {}^{10}\log \frac{\gamma}{c} \text{ Volt.}$$

2. **Prinzip der Konzentrationskette.** Wenn wir also die Konzentration der gelösten Ionen bestimmen wollen, müssen wir das soeben erläuterte Potential messen.

Wir haben nun keine allgemeine Methode, um den absoluten Wert eines solchen Potentials zu messen, sondern wir können nur die elektromotorische Kraft einer galvanischen Kette bestimmen, welche erstens aus unserer Elektrode als einem Pol und einer zweiten, willkürlichen, aber immer gleich beschaffenen Vergleichselektrode als zweitem Pol besteht. Als solche Vergleichselektrode wählen wir der Einfachheit halber zunächst die Normalelektrode, d. h. eine Lösung des betreffenden Metallsalzes in solcher Konzentration, daß die freien Ionen des Metalls einfach normal sind. Wir hätten z. B. die Aufgabe, die Konzentration, c, der Ag·-Ionen in einer unbekannten Silbernitratlösung zu bestimmen. Dann setzen wir folgendes galvanische Element zusammen (Fig. 124).

Fig. 124.



Schema einer Silber-Konzentrationskette.

Auf der linken Seite befindet sich eine Silberelektrode, welche in die zu messende Lösung mit der unbekannten Ag·-Konzentration c steckt, auf der rechten Seite eine Silberelektrode, welche in eine einfach normale Lösung von Ag·-Ionen, d. h. eine 1·1fach normale Lösung von Silbernitrat taucht, deren Ag-Ionengehalt infolge der unvollständigen Dissoziation des Silbersalzes gerade 1fach normal ist. Die beiden Flüssigkeiten c und C berühren sich direkt. Nunmehr schließen wir die beiden Pole durch einen Metalldraht über ein Voltmeter V und beobachten z. B. einen Strom von der elektromotorischen Kraft E = 0·0374 Volt bei einer Zimmertemperatur von 18° C.

Die gesamte elektromotorische Kraft dieses Elementes besteht nun nach den Grundsätzen der Elektrochemie aus der Differenz des Potentials der linken Elektrode und der rechten Elektrode, $E_l - E_r$. Nun hat E_l den Wert

$0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, \log \frac{\gamma}{c}$ und E_r den Wert $0.0001983 \,.\, T \,.\, \log \frac{\gamma}{C}$. Im ganzen ist daher

$$E = E_l - E_r = 0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, \left(\log \frac{\gamma}{c} - \log \frac{\gamma}{C}\right)$$

oder

$$E = 0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, (\log \gamma - \log c - \log \gamma + \log C).$$

Die Konstante γ fällt daher fort, als Ausdruck dafür, daß γ nur von der Natur der metallischen Elektrode abhängig ist und beiderseits die gleiche Elektrodenart, Silber, ist. So ist also

$$E = 0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, (\log C - \log c). \tag{2}$$

In unserem Fall ist $C = 1$, daher $\log C = 0$, und

$$E = -\,0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, \log c$$

daher

$$\log c = -\frac{E}{0{\cdot}0001983 \,.\, T}$$

oder mit Einsetzung der speziellen Werte für T und E

$$\log c = -\frac{0{\cdot}0374}{0{\cdot}0001983\,(373 + 18)} = -\,0{\cdot}6482.$$

Diese negative Zahl müssen wir, um ihren Numerus aus der Logarithmentafel entnehmen zu können, in eine positive mit negativer Kennziffer umwandeln und schreiben dafür $0{\cdot}3518 - 1$.

Der dazu gehörige Numerus ist 0·225.

Wir haben somit gefunden, daß die Konzentration unserer Silberlösung 0·225 normal in Bezug auf Ag-Ionen ist.

3. **Wasserstoff-Konzentrationsketten.** Wollen wir nun diese Methode zur Messung der H-Ionenkonzentration einer Lösung verwenden, so müssen wir Elektroden aus Wasserstoff anwenden. Es verhält sich nun eine mit Platinschwarz überzogene Platinoberfläche, welche gasförmigen Wasserstoff absorbiert hat, in elektrochemischer Beziehung so, als ob sie aus metallischem Wasserstoff bestünde; das Platin hat keine elektromotorische Wirksamkeit. Eine Legierung aus einem edlen und einem unedlen Metall verhält sich nämlich elektromotorisch so, als ob sie allein aus dem unedleren Metall bestände. Dabei ist aber zu beachten: 1. daß das Platin kein anderes, elektromotorisch wirksames Gas, wie O_2, Cl_2 u. dgl., absorbiert enthält, 2. daß beide Platinelektroden sich in einer Wasserstoffatmosphäre von gleichem Druck befinden, weil sie ohne die Erfüllung dieser Bedingung gegeneinander ein Potential zeigen würden, welches nichts mit der gesuchten Ionenkonzentration, sondern mit der verschiedenen Beschaffenheit der Elektroden zu tun hätte.

Theoretisch wäre es ebenso gut denkbar, die Platinelektroden mit O_2 zu sättigen und die Hydroxylionenkonzentration zu messen, was ja für die Bestimmung der Azidität bzw. Alkalität einer Flüssigkeit ebensogut verwertbar wäre als die Bestimmung der H·-Konzentration, denn aus der Formel

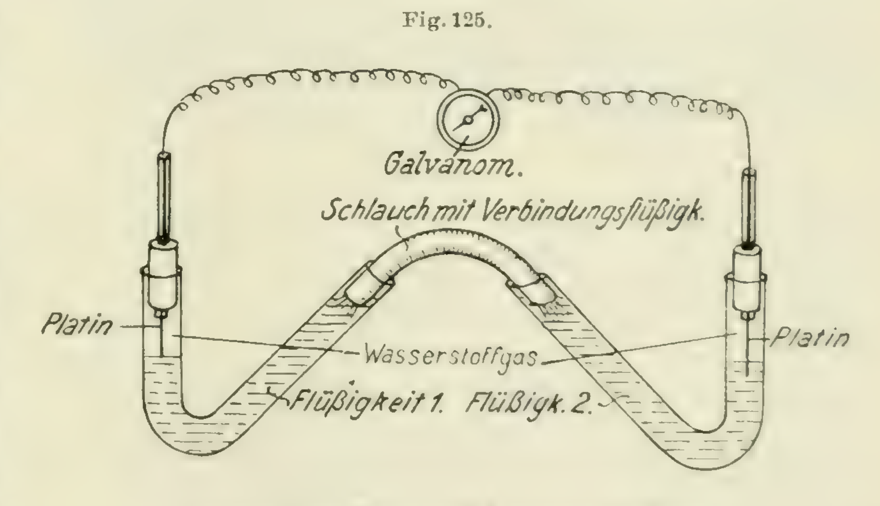
$$[H^{\cdot}] \, . \, [OH'] = \text{Dissoziationskonstante des Wassers}$$

läßt sich $[H^{\cdot}]$ aus $[OH']$ und umgekehrt berechnen.

Es hat sich aber erwiesen, daß die Sauerstoffelektrode für die Praxis unbrauchbar ist, weil sie inkonstante Werte liefert.

Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration c einer unbekannten Flüssigkeit würde sich demnach schematisch folgendermaßen gestalten: Man setzt ein galvanisches Element zusammen, dessen beide Elektroden aus wasserstoffbeladenem Platin bestehen. Die eine Elektrode taucht in eine Lösung, deren H·-Ionenkonzentration bekannt ist, z. B. einfach normal, die andere in die unbekannte Lösung. Die beiden Flüssigkeiten werden durch eine flüssige, nicht metallische Leitung verbunden. Die beiden Platinpole werden metallisch verbunden und die elektromotorische Kraft des Stromes gemessen.

Fig. 125.



Schema einer Wasserstoff-Konzentrationskette.

4. **Das Diffusionspotential.** Von besonderer Wichtigkeit ist es nun, welche Flüssigkeit wir zur Verbindung der beiden Lösungen benutzen sollen. Der einfachste Fall ist der, daß man eine der beiden Flüssigkeiten selbst dazu benutzt. Die Schwierigkeit liegt nun darin, daß an der Berührungsstelle zweier verschiedener Flüssigkeiten eine Potentialdifferenz entsteht, welche die EMK der Kette in unerwünschter Weise beeinflußt. Dieses „Diffusionspotential“ kann man nun in zweierlei Weise berücksichtigen. Entweder bringt man es in Rechnung, in besonders einfachen Fällen, wo es sich berechnen läßt. Die zweite, allgemeinere Methode besteht darin, daß man der Mittelflüssigkeit eine solche Beschaffenheit erteilt, daß das Diffusionspotential verschwindend klein wird. Die zweite Methode ist im allgemeinen vorzuziehen, weil es nur wenige Fälle gibt, in denen sich das Diffusionspotential auf einfachem Wege genau berechnen läßt. Solche Fälle sind nämlich nur folgende:

1. Wenn die beiden Flüssigkeiten nur je einen Elektrolyten, und zwar einen und denselben enthalten: die Konzentration dieses Elektrolyten kann dann in den beiden Flüssigkeiten verschieden sein. Das Diffusionspotential e beträgt in diesem Falle $e = R\,T \ln \frac{c_1}{c_2}$ oder $= 0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, {}^{10}\log \frac{c_1}{c_2}$, wo c_1 und c_2 die beiden Konzentrationen des Elektrolyten bedeuten.

2. Wenn die beiden Flüssigkeiten zwei verschiedene Elektrolyte, aber in gleicher Konzentration enthalten. Dann ist

$$e = R\,T \ln \frac{u_1 + v_2}{u_2 + v_1} \text{ oder } 0{\cdot}001983 \,.\, T \,.\, {}^{10}\log \frac{u_1 + v_2}{u_2 + v_1},$$

wo u_1 und v_1 die Wanderungsgeschwindigkeiten des Kations bzw. Anions des einen Elektrolyten, u_2 und v_2 die des anderen bedeuten. Ein solcher Fall liegt z. B. vor, wenn die eine Flüssigkeit n HCl, die andere n NaCl ist.

Um diese Formel auswerten zu können, ist es nötig, die Wanderungsgeschwindigkeit der gebräuchlicheren Ionen zu kennen. Sie beträgt für einige einwertige Ionen bei 18°:

	u		v		u		v
K·	64·67	F′	46·64	NH_4·	64·4	OH′	174
Na·	43·55	Cl′	65·44	Tl·	66·00	HCOO′	46·7
Li·	33·44	Br′	67·63	Ag·	54·02	CH_3.COO′	35·0
Rb·	67·6	J′	66·40	H·	329·8		
Cae·	68·2	SCN′	56·63				

So ist z. B. das Diffusionspotential n HCl/n NaCl bei 18°:

$$e = 0{\cdot}0577 \,.\, \log \,.\, \frac{329{\cdot}8 + 65{\cdot}44}{43{\cdot}55 + 65{\cdot}44} = 0{\cdot}0577 \,.\, \log \,.\, 0{\cdot}5592$$

$$= 0{\cdot}0577\,(0{\cdot}7474 - 1) \text{ oder } -0{\cdot}0577 \,.\, 0{\cdot}2526$$
$$= -\,0{\cdot}0145 \text{ Volt.}$$

Das — (Minuszeichen) gibt die Richtung des Diffusionspotentials an. Es ist natürlich rein konventionell, welche Richtung man als + und welche man als — bezeichnet. Es ist für die Verwertung des Diffusionspotentials aber absolut notwendig, seine Richtung zu kennen, weil es von dieser abhängt, ob man dasselbe zu der gemessenen EMK der Kette zu addieren oder von ihr zu subtrahieren hat. Ein Beispiel wird zeigen, durch welche Überlegung man das im Einzelfall herausbekommen kann. Gegeben sei die Kette

1		2		3		4		5
Pt H_2	|	$\frac{n}{8}$ HCl	|	$\frac{n}{8}$ NaCl	|	Blutserum	|	Pt H_2
	a		b		c		d	

Das Potential a entsteht dadurch, daß die Platin-H_2-Elektrode H-Ionen in die Flüssigkeit zu senden sucht, während andrerseits aus der Flüssigkeit 2 H-Ionen in Form von H_2 sich auf der Elektrode abzuscheiden

suchen. Ganz ähnlich entsteht das Potential d. Da aber in 2 mehr H-Ionen gelöst sind als in 4, so werden sich mehr positiv geladene H˙-Ionen aus 2 zu entfernen suchen, als aus 4, d. h. die Flüssigkeit 2 hat gegen 1 eine negative Ladung. Schließen wir die beiden Elektroden metallisch, so wird der positive Strom in der Richtung 5—4—3—2—1—Schließungsdraht—5 laufen.

Nunmehr betrachten wir das Diffusionspotential b. Es entsteht durch die größere Wanderungsgeschwindigkeit des H˙ gegenüber dem Na˙. Wenn die Flüssigkeiten 2 und 3 im Diffusionsaustausch miteinander stehen, so suchen in der Zeiteinheit mehr H-Ionen von 2 nach 3 zu diffundieren, als Na-Ionen von 3 nach 2. Infolgedessen findet sich in 3 ein Überschuß von H˙-Ionen, und 3 lädt sich positiv gegen 2. Es wird also positive Elektrizität in der Richtung 2—3 transportiert, also in entgegengesetzter Richtung als vorher. Wenn wir die EMK der ganzen Kette messen, so werden wir infolge des Diffusionspotentials b einen zu kleinen Wert bekommen, wir müssen infolgedessen das zu berechnende Diffusionspotential zu dem gemessenen Wert der Kette addieren, um den reinen Wert der Konzentrationskette zu bekommen.

Auch das Diffusionspotential c müßte man in dieser Weise berücksichtigen. Das ist aber im vorliegenden Fall nicht nötig, weil es annähernd $= 0$ ist. Denn $\frac{n}{8}$ NaCl ist chemisch dem Blutserum so ähnlich, daß das Diffusionspotential vernachlässigt werden kann. Das Diffusionspotential erreicht gewöhnlich nur in dem Fall einen merklichen Betrag, wenn eine der beiden Flüssigkeiten H- oder OH-Ionen in größerer Menge enthält. Für das Diffusionspotential ist ja nur der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Ionenarten maßgebend, und die H˙ und OH′ zeigen die von den übrigen Ionen abweichendsten, nämlich größten Werte für die Wanderungsgeschwindigkeit.

Die zweite Methode, die **Vernichtung** des Diffusionspotentials, erfordert eine ganz bestimmte Beschaffenheit der Mittelflüssigkeit. Das Diffusionspotential zwischen irgend zwei Flüssigkeiten wird nämlich dadurch verkleinert, daß man zwischen dieselben eine möglichst konzentrierte Lösung eines sehr leicht löslichen Elektrolyten einschaltet, dessen Anion und Kation möglichst genau einander gleiche Wanderungsgeschwindigkeiten haben. Diese Bedingung erfüllen nur zwei Salze: KCl und $(NH_4)NO_3$. Ammoniumnitrat hat den Vorzug noch größerer Löslichkeit, aber den Nachteil, daß es in Berührung mit alkalischen Flüssigkeiten Ammoniak abspaltet. Deshalb ist im allgemeinen KCl vorzuziehen, welches den Zweck um so besser erfüllt, in je höherer Konzentration es angewendet wird. Im allgemeinen genügt es also, einfach eine gesättigte Lösung von KCl zwischenzuschalten, um das Diffusionspotential auf den praktisch zu vernachlässigenden Wert von <1 Millivolt herabzudrücken. Nur in seltenen Fällen ist dieses Mittel nicht ganz sicher, wenn nämlich die H˙ oder OH′-Konzentration einer der Flüssigkeiten erheblich größer als etwa 10^{-3} norm. ist. In diesem Fall hilft man sich

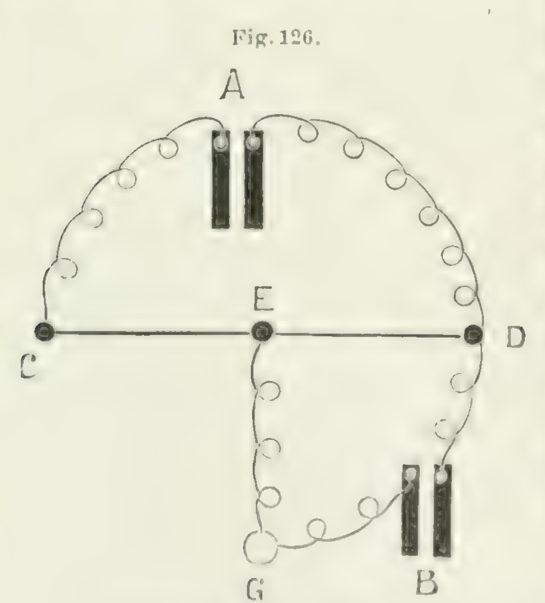
nach *Bjerrum*[1]) auf folgende Weise. Wie gesagt, ist die potentialvernichtende Eigenschaft der KCl-Lösung um so größer, je konzentrierter sie angewandt wird. Schaltet man nun in einem Versuch zwischen die beiden Lösungen eine gesättigte KCl-Lösung, in einem zweiten Versuch eine halbgesättigte KCl-Lösung und findet, daß die EMK der Kette in beiden Fällen ganz gleich ist, so heißt das: schon durch die halbgesättigte KCl-Lösung wird das Diffusionspotential ganz vernichtet; die Anwendung der ganz gesättigten KCl-Lösung brachte keine Änderung mehr hervor. In diesem Falle sind wir sicher, das Kontaktpotential wirklich vernichtet zu haben.

Finden wir dagegen, daß mit ganz gesättigter Lösung die EMK der Kette 0·202 Volt, mit halbgesättigter KCl-Lösung dagegen 0·204 Volt ist, so heißt das: die halbgesättigte KCl-Lösung reichte zur völligen Vernichtung des Diffusionspotentials nicht aus, denn die ganz gesättigte KCl-Lösung vernichtete noch weitere —0·002 Volt. Man kann nun mit einer für die Praxis ausreichenden Genauigkeit annehmen, daß der wahre Wert der Konzentrationskette erhalten wird, wenn man durch Extrapolation von den 0·204 Volt diese —0·002 Volt noch einmal abzieht, also den Wert zu 0·206 Volt annimmt. Es handelt sich hier immer um sehr kleine Korrekturen, so daß diese Extrapolation gestattet ist.

Für gewöhnlich ist aber die einfache Messung mit zwischengeschalteter gesättigter KCl-Lösung durchaus ausreichend.

5. **Messung von elektromotorischen Kräften.** Nunmehr müssen wir uns im Prinzip mit der Methode beschäftigen, mit der die EMK einer Kette gemessen wird. Die beste ist die Kompensationsmethode nach *Poggendorff* und *Du Bois-Reymond*. Sie ist eine sogenannte „Nullmethode" und beruht darauf, daß man in den Stromkreis des zu messenden galvanischen Elementes eine zweite elektromotorische Kraft, welche veränderlich und berechenbar ist, entgegenschaltet und sie so reguliert, daß die Summe der EMK im Stromkreis = 0 ist. Alsdann ist die gesuchte EMK gleich der entgegengeschalteten, berechenbaren EMK. (Fig. 126.)

Fig. 126.



Schema der Messungsmethode.

Das Prinzip ist folgendes:

A sei ein galvanisches Element von genau bekannter EMK. Die Drähte *AC* und *AD* leiten gut, der Draht *CD* stellt einen hohen Widerstand dar. Dann findet zwischen *C* und *D* der Abfall des gesamten Potentials des galvanischen Elementes *A* statt. Der Punkt *E*

[1]) *Bjerrum*, Zeitschr. f. physikal. Chemie. 53, 428 (1905).

sei verschieblich („Brückenkontakt"). Dann herrscht zwischen den Punkten D und E ein Potential, welches sich berechnet wie folgt:

$$\text{Potential}_{D-E} : \text{Potential}_{D-C} = \text{Widerstand}_{D-E} : \text{Widerstand}_{D-C}.$$

Von den Punkten D und E wird ein Nebenstromkreis $EGBDE$ abgeleitet, in den die zu messende EMK, B und das Galvanometer G eingeschaltet ist. Durch Verschiebung gibt man dem Punkte E diejenige Lage, bei der das Galvanometer in Ruhestellung ist. Dann ist die gesuchte EMK des Elementes B gleich dem Potential zwischen den Punkten D und E und diese wiederum

$$= \text{EMK des Elementes } A \times \frac{\text{Widerstand}_{E-D}}{\text{Widerstand}_{C-D}}$$

Der Widerstand CD kann entweder in Form des Brückendrahtes benutzt werden, wie es für Leitfähigkeitsbestimmungen in Gebrauch ist, besser aber nimmt man an seiner Stelle zwei hintereinandergeschaltete Widerstandssätze zu je 1 bis 1110 Ohm. Man legt sämtliche Stöpsel des einen Rheostaten ganz beiseite und verteilt die des anderen zwischen die beiden Rheostaten, so jedoch, daß der Gesamtwiderstand der Rheostaten zusammen stets 1110 Ω beträgt. Das Hin- und Herstöpseln einzelner Widerstände entspricht dann dem Verschieben des Brückenkontaktes.

6. **Stromquelle.** Als Stromquelle, A, benutzt man am besten einen gewöhnlichen Bleiakkumulator. Seine EMK, die für die weitere Rechnung bekannt sein muß, muß vor jedem Versuch bestimmt werden.

Dies geschieht auf folgende Weise: Vor Beginn des eigentlichen Versuches wird der Akkumulator nach dem Schema Fig. 126 und 127 eingeschaltet und an Stelle des Elementes B ein „Normalelement" von genau bekannter und unveränderlicher EMK eingeschaltet. Dazu benutzt man gewöhnlich ein Westonelement, welches eine EMK von 1·019 Volt besitzt. Nunmehr wird durch Umstöpselung der Widerstände der Widerstand ED so reguliert, daß der Stromkreis $EDBGE$ stromlos ist. Dazu ist natürlich notwendig, daß die Stromrichtung des Normalelementes in diesem Stromkreis der des Akkumulators entgegengesetzt geschaltet ist. Angenommen, dieser Umstand sei erreicht, wenn $ED = 600\,\Omega$ ist, dann ist

$$\text{EMK}_{\text{Akkum.}} : \text{EMK}_{\text{Westonel.}} = 1110 : 600$$

und

$$\text{EMK}_{\text{Akkum.}} = \frac{1110}{600} \cdot 1{\cdot}019 \text{ Volt.}$$

Jedes Ohm, das sich in dem Rheostat entsprechend der Brückenstrecke DE befindet, entspricht demnach

$$\frac{1110}{600} \cdot \frac{1{\cdot}019}{1110} = \frac{1{\cdot}019}{600} \text{ Volt.}$$

Zur dauernden Stromentnahme darf das Normalelement nicht benutzt werden, sondern nur für den Zweck der Messung des Akkumulators.

Man kann nun viele Rechnungen ersparen, wenn man eine Stromquelle von 1·110 Volt benutzt. Dann bedeutet jedes Ohm der Brückenstrecke

DE gerade 0·001 Volt. Eine solche Stromquelle benutze ich seit langem durch folgende Anordnung. Zwischen die Punkte *A* und *C* wird ein regulierbarer Vorschaltwiderstand eingeschaltet. Man erteilt nun der Strecke *ED* den Widerstand 1019 Ω, der Strecke *CE* also den Rest (1110 — 1019) = 81 Ω. In *B* befindet sich das Normalelement von 1·019 Volt. Nun reguliert man den Vorschaltwiderstand derartig, daß das Galvanometer genau stromlos ist. Dann wird die gesamte EMK des Akkumulators geteilt, ein Teil dieses Potentials fällt auf dem Wege des Vorschaltwiderstandes ab, der andere, allein für den Brückenstromkreis benutzte zwischen *C* und *D*. Da 1019 Ω auf der Strecke *ED* einer EMK von 1·019 Volt des Normalelements entsprechen, so bedeutet jedes Ω des Rheostat *ED* genau 1 Millivolt. Die Bestimmung der EMK bis auf ganze Millivolt ist praktisch völlig ausreichend. Schätzungen der Zehntelmillivolt sind aus der Höhe des Elektrometerausschlags möglich. Findet man z. B., daß der Wert 0·0507 nur eine Spur zu groß, 0·0506 aber sehr merklich zu klein ist, so wird man 0·05068 abschätzen.

Die genauere Beschaffenheit der einzelnen Teile des Apparates.

In Fig. 126 ist nun die gesamte Anordnung abgebildet, die wir im Schema bisher kennen gelernt haben. Die einzelnen Teile des Apparats haben des Näheren folgende Beschaffenheit:

a) Der Akkumulator.

Man benutzt einen gewöhnlichen, einzelligen Bleiakkumulator von beliebiger Größe. Er wird durch hochgespannten Gleichstrom geladen, indem man den mit + vorbezeichneten Pol mit dem positiven Pol des Starkstromes den mit — bezeichneten mit dem negativen Pol verbindet und 1—2 Glühlampen (bei einem Strom von 110 Volt) zwischenschaltet. Die Ladung geschieht solange, bis die Gasentwicklung im Akkumulator lebhaft zu werden beginnt, was je nach der Kapazität des Akkumulators verschieden lange Zeit, meist mehrere Stunden, in Anspruch nimmt. Jetzt ist der Akkumulator „überspannt" infolge der Beladung mit gasförmigem H_2 und O_2. Erst wenn der Akkumulator mehrere Stunden durch einen Widerstand von 1000—2000 Ω geschlossen gewesen ist (also einfach in dem Stromkreis des Versuches), beginnt er, eine konstantere Ladung anzunehmen, welche zuerst > 1·95 Volt ist und im Laufe von Tagen oder Wochen, je nach Benutzung, um ein weniges, etwa auf 1·8 Volt abfällt. Dann tritt eine rapide weitere Entladung ein und der Akkumulator muß aufs Neue geladen werden. Der Akkumulator muß während des Versuches häufig auf seine EMK geprüft werden, oder wenn man mit Vorschaltwiderstand arbeitet, muß dieser häufig reguliert werden, indem stets das Normalelement als Vergleichsobjekt benutzt wird.

b) Der Vorschaltwiderstand.

Er ist nicht durchaus erforderlich, aber angenehm. Er besteht zweckmäßig aus einem festen Widerstand aus Rheotandraht von zirka 800 Ω,

Fig. 127.

Akkumulatur

Gaskette

2.3

2.3

2,3

1

1

1

1

2, 3

3

3

2,3

3

3

2

3

2

2

2, 3

2, 3

2 3

2,3

kreis (1)

Vorschalt widerstand

Meßbrucke in Gestalt zweier Rheostaten

Kapillar-elektrometer

Schlüssel für den Nebenstrom kreis 2 und 3

Umschalter: entweder Stromkreis 2 oder 3 einzuschalten

Normal-element

Gesamtansicht der Apparatur.

einem gröberen, von 5 zu 5 Ω regulierbaren Widerstand von insgesamt 100 Ω und einem fein regulierbaren Schieberwiderstand von insgesamt etwa 10 Ω. Durch die beiden regulierbaren Widerstände geschieht die gröbere und zum Schluß die feine Regulierung des Vorschaltwiderstandes. Sehr zu empfehlen ist statt dessen auch ein zusammengekoppelter gröberer und feinerer regulierbarer Gleitwiderstand (wie in Fig. 4).[1])

c) Die Meßbrücke.

Die „Meßbrücke" ist entweder die von den Leitfähigkeitsbestimmungen her bekannte, oder sie besteht wie in Fig. 127 am besten aus zwei gleichen Widerstandskästen zu je 1110 Ω, enthaltend:

1 × 1 Ω = 1
2 × 2 Ω = 4
1 × 5 Ω = 5
1 × 10 Ω = 10
2 × 20 Ω = 40
1 × 50 Ω = 50
1 × 100 Ω = 100
2 × 200 Ω = 400
1 × 500 Ω = 500
= 1110 Ω.

Bei Nichtgebrauch müssen die Stöpsel locker eingesteckt werden. Zum Gebrauch werden zunächst alle Stöpsel des einen Rheostaten entfernt. Die eingesteckten Stöpsel müssen fest eingedreht werden. Von Zeit zu Zeit werden die Stöpsel mit Petroleum zur Säuberung abgerieben, im Notfall mit Schmirgelpapier zart abgerieben.

d) Das Elektrometer.

Als Elektrometer kommen in Betracht: ein sehr empfindliches Nadelgalvanometer, oder ein Spiegelgalvanometer, oder ein Saitengalvanometer, oder ein Kapillarelektrometer. Zur Einübung der Methode dient zunächst am einfachsten irgend ein empfindliches Nadelgalvanometer. Weiterhin aber empfehle ich mit aller Entschiedenheit das Kapillarelektrometer, und zwar in der Form, wie sie *Ostwald* gegeben hat. Einige ganz unbedeutende, dem Zweck angepaßte Abänderungen hat das Kapillarelektrometer in der Form erfahren, wie es der Apparatur für Gasketten (Vereinigte Fabriken für Laboratoriumsbedarf) auf meine Veranlassung beigegeben wird.

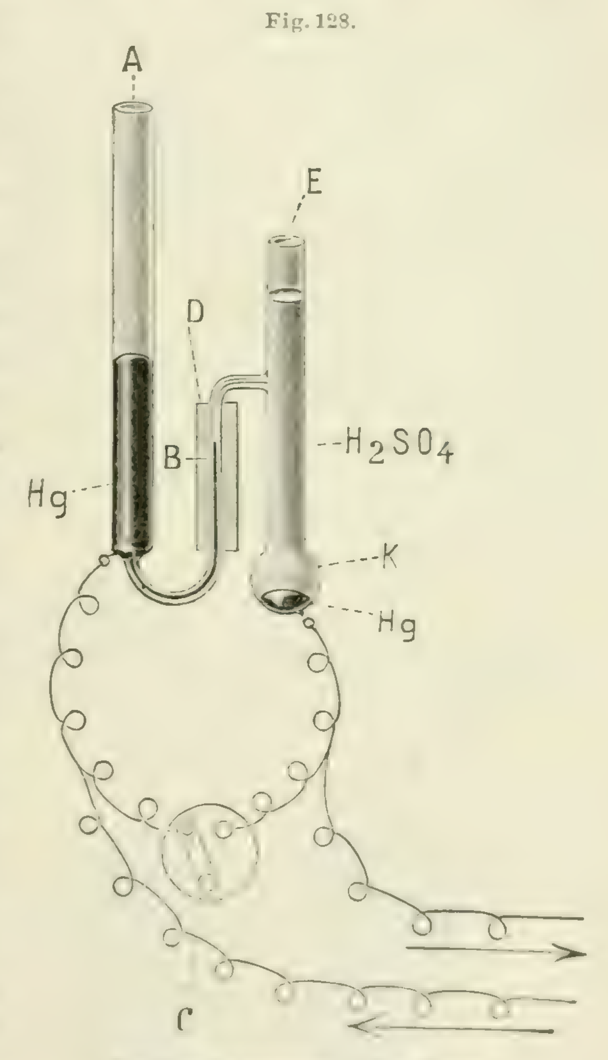
Das Kapillarelektrometer wird folgendermaßen für den Gebrauch vorbereitet. Man verschaffe sich Quecksilber, welches von unedleren Metallen absolut rein ist. Man erhält dies aus gewöhnlichem käuflichen Quecksilber, indem man dieses mit einer starken Lösung von Merkuronitrat (in destilliertem Wasser) längere Zeit durchschüttelt, dann die Merkurinitratlösung abgießt, mehrere Male mit destilliertem (auf keinen Fall

[1]) Ein für diese Zwecke geeigneter Widerstand wird auf meine Veranlassung in den Vereinigten Fabriken für Laboratoriumsbedarf vorrätig gehalten.

Leitungswasser mit Hg in Berührung bringen!) Wasser wäscht, das Quecksilber in einer Porzellanschale mit Filtrierpapier trocken saugt und filtriert. Quecksilber wird filtriert, indem man ein gewöhnliches Filter in einen Trichter einpaßt und in die Spitze des Filters mit einer feinen (nicht rostigen!) Nadel ein Loch stößt.

Das so gereinigte Quecksilber wird in die Öffnung *A* eingefüllt, bis es in den anderen Schenkel überläuft und teilweise in die Kugel *K* abtropft. Die Quecksilbermasse zerreißt dann und es bleibt ein Niveau bei *B* bestehen. Man achte ja darauf, daß in der Kugel *K* so viel Hg sich befindet, daß der eingeschmolzene Platinkontakt ganz von Hg bedeckt ist.

Fig. 128.



Kapillarelektrometer (ohne Stativ).

Eine besondere Reinigung der Glaskapillare vor der Füllung ist bei frischen Röhren nicht notwendig. Schon gebrauchte Röhrchen lassen sich nur mühsam zunächst mit Schwefelsäurebichromatmischung, dann lange mit durchgesaugtem destillierten Wasser, Alkohol, Äther, Luft wieder reinigen.

Nach Einfüllung des Quecksilbers wird in die Öffnung *E* eine Mischung von 1 Volum konzentrierter H_2SO_4 + 6 Volum Wasser eingefüllt, durch Wippen die Luftblasen bei *B* entfernt, so daß der Quecksilbermeniskus *B* die Schwefelsäure gut berührt. Die beiden Zuleitungsdrähte müssen stets kurz geschlossen werden, was durch den Tauchkontakt *C* geschieht, und nur unmittelbar vor dem Gebrauch darf dieser Tauchkontakt höchstens auf wenige Sekunden geöffnet werden. Ist das Elektrometer in guter Ordnung, so darf sich der Quecksilbermeniscus nach diesem Öffnen absolut nicht bewegen.

Die Beobachtung des Quecksilbermeniskus geschieht durch ein kleines Mikroskop, in dessen Okular eine Teilung eingeätzt ist. Auf die Außenseite (die dem Mikroskop zugewandte Seite) der Kapillare wird ein Stück eines Deckgläschens *D* mit Kanadabalsam befestigt, um die gewölbte Oberfläche der Kapillare zu ebnen und das mikroskopische Bild des Meniscus zu verschärfen.

Das Kapillarelektrometer ist ein vorzügliches, aber in der Hand des Ungeübten oft launisches Instrument. Bald ist es hochempfindlich, bald

in unbrauchbarer Weise unempfindlich. Einige Regeln werden nützlich sein, wenn man das Elektrometer gut instand halten will.

Man lasse das Elektrometer nie „geöffnet“ stehen.

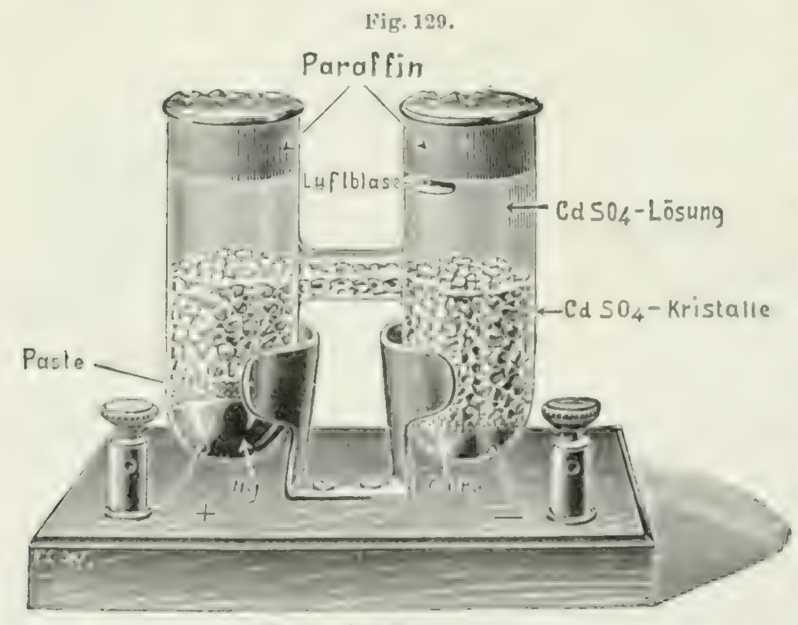
Man schicke niemals einen starken Strom durch das Elektrometer. Ist dies dennoch geschehen, so beobachte man, ob sich eine Gasblase am Meniskus gebildet hat. Ist das der Fall, so bringe man durch Anblasen der Öffnung *A* einen Tropfen Quecksilber von dem Meniskus nach *K* herüber, um einen neuen Meniskus zu bilden. Außerdem beobachte man, ob der Meniskus nach dem Öffnen des Tauchkontaktes spontan steigt oder fällt. Ist das der Fall, so lasse man das Elektrometer so lange kurz geschlossen, bis nach dem Öffnen keine spontane Bewegung mehr eintritt.

Man überzeuge sich gelegentlich, ob der Meniskus frei beweglich ist, indem man eine sehr schwache EMK an das Elektrometer anlegt. Als solches kann man ein kleines galvanisches Element benutzen, das man z. B. aus einem Kupferdraht, einem Messingdraht und dem angefeuchteten Finger improvisiert. Mitunter ist die Beweglichkeit des Meniskus rein mechanisch durch Staubteilchen beeinträchtigt. Gelingt es nicht, durch leichtes Anblasen die Beweglichkeit wieder herzustellen, so blase man einen neuen Meniskus ab. Sehr zu empfehlen sind die neuerdings von *F. Köhler* (Leipzig) in den Handel gebrachten fertig gefüllten, zugeschmolzenen Capillarelektrometerröhren.

e) Das Normalelement.

Das gebräuchlichste Normalelement ist das sogenannte Weston-element. Man füllt ein H-förmiges Gefäß, dessen beide Schenkel mit Zuführungsdrähten von Platin versehen sind, auf der einen Seite mit einer Schicht ganz reinen Quecksilbers, auf der anderen Seite mit einer Schicht Kadmiumamalgam. Dieses Amalgam wird hergestellt durch Zusammenschmelzen von 1 Teil von ganz reinem Kadmium und 7—8 Gewichtsteilen reinen Quecksilbers. Das Amalgam erstarrt bei Zimmertemperatur zu einem Brei. Es wird flüssig in das H-Gefäß eingegossen und erstarrt in demselben bald. Die Höhe der Schicht muß beiderseits so groß sein, daß die eingeschmolzenen Platindrähte ganz verdeckt werden. Dann bereitet man sich eine ge-

Fig. 129.



Westonsches Normalelement.

sättigte Lösung von reinem kristallisiertem Kadmiumsulfat durch Verreiben gleicher Gewichtsteile des Salzes und von Wasser. Die gesättigte Lösung wird zu weiterem Gebrauch abgegossen und von dem restierenden Kristallbrei eine Schicht von etwa 5 *mm* Höhe auf das Kadmiumamalgam geschichtet. Eine andere Portion des Breies mit etwas Merkurosulfat, etwas Quecksilber und etwas gesättigter Kadmiumsulfatlösung verrieben, dekantiert, die Kadmiumsulfatlösung abgegossen und durch neue ersetzt und auf gleiche Weise mehrere Male mit Kadmiumsulfatlösung gewaschen, um alle leicht löslichen Hg-Salze zu entfernen, die das Merkurosulfat etwa als Verunreinigung enthalten haben könnte. Schließlich wird die gewaschene Paste in einer 5 *mm* hohen Schicht auf das Quecksilber des H-Gefäßes geschichtet. Nun werden die Schenkel des H-Gefäßes mit erbsgroßen Kristallen von Kadmiumsulfat beschickt und mit gesättigter Kadmiumsulfatlösung angefüllt. Die beiden Schenkel werden mit geschmolzenem Paraffin geschlossen, indessen man Sorge trägt, daß eine Luftblase unter dem Paraffin bestehen bleibt, damit bei Ausdehnung durch die Wärme das Gefäß nicht zersprengt wird. Auf das Paraffin kann man noch eine Korkscheibe decken und darauf Siegellack gießen. Das Element ist sofort gebrauchsfertig.

Die EMK des Westonelementes beträgt bei

0°	5°	10°	15°	20°	25°	30°	
1·0189	1·0189	1·0189	1·0188	1·0186	1·0184	1·0181	Volt.

Die Abweichungen davon betragen bei Anwendung reiner Reagenzien nicht mehr als höchstens ± 0·2 Millivolt. Es können natürlich auch Elemente benutzt werden, die einen etwa um 1 Millivolt abweichenden Wert haben, nur muß diese Abweichung beständig und bekannt sein.

Das Normalelement darf niemals zu einer irgendwie erheblichen Stromentnahme benutzt werden. Ist dies dennoch versehentlich geschehen (Kurzschluß), so regeneriert sich das Element ganz allmählich erst wieder spontan und darf zu Messungszwecken erst wieder benutzt werden, wenn es eine konstante EMK angenommen hat, also am nächsten Tage.

Die physikalisch-technische Reichsanstalt übernimmt die Aichung solcher Normalelemente.

f) Die Gaskette.

Die Gaskette ist ein galvanisches Element, welches aus der Vergleichselektrode und der Untersuchungselektrode besteht. Als Vergleichselektrode benutzt man entweder eine Wasserstoffelektrode mit einer genau bekannten Säurelösung oder die Dezinormalkalomelelektrode. Die Herstellung der Wasserstoffelektrode geschieht genau auf dem gleichen Wege, wie es sogleich für die Untersuchungselektrode beschrieben werden wird. Zu besprechen ist nur noch die Säurelösung, mit welcher dieselbe gefüllt werden soll. Diese muß folgende Bedingungen erfüllen: die H-Konzentration muß genau bekannt sein und die Lösung muß so beschaffen sein, daß das Diffusionspotential gegen die Mittelflüssigkeit entweder verschwindend klein

oder genau berechenbar ist. Diesen Bedingungen wird durch eine der folgenden Anordnungen genügt:

Elektrodenflüssigkeit	zugehörige Mittelflüssigkeit
a) Salzsäure (am besten $\frac{n}{10}$)	NaCl in gleicher Konzentration (also gewöhnlich $\frac{n}{10}$),
b) 0·01 n HCl + 0·1 n NaCl (d. h. 10 *cm*³ $\frac{n}{10}$ HCl + 10 *cm*³ n . NaCl + 80 *cm*³ Wasser)	0·1 n NaCl,
c) noch besser: 10 *cm*³ n NaOH + 20 *cm*³ n Essigsäure, mit dest. Wasser aufgefüllt auf 100 *cm*³	gesättigte KCl-Lösung.

Bei der Anordnung *a)* ist das Diffusionspotential nach der Formel S. 504 berechenbar. Es beträgt:

Temperatur	Volt
18°	0·0145
38°	0·0154.

Dieses Diffusionspotential muß zu der gemessenen EMK der Gaskette addiert werden. Die H·-Konzentration der Vergleichslösung, $\frac{n}{10}$ HCl, beträgt 0·091 n, weil die HCl in dieser Verdünnung zu 91% dissoziiert ist.

Die Anordnung *b)* ist von *Bugarski* so gewählt, weil durch das zugefügte NaCl das Diffusionspotential ausgeschaltet werden sollte. Dieses beträgt aber in Wirklichkeit immer noch 0·0056 Volt, welche von der EMK der Gaskette abgezogen werden müssen. Die H·-Konzentration der Vergleichslösung beträgt nicht 0·0096 n, wie es einer reinen 0·01 HCl entspräche, sondern weil die Dissoziation des HCl durch den Überschuß des NaCl etwas zurückgedrängt wird, nur 0·0091 n.

Die Anordnung *c)* hat den Vorteil, daß das Diffusionspotential = 0 und die H·-Konzentration der Vergleichslösung sehr genau bekannt, $= 2{\cdot}37 \cdot 10^{-5}$ n ist. Sie hat aber den Nachteil, daß, weil die H·-Konzentration der Vergleichslösung so niedrig ist, die H·-Konzentration der Versuchslösung bald größer, bald kleiner als diese sein wird, so daß man immer die Stromrichtung beachten muß, was bei den anderen Anordnungen in der Regel unnötig ist.

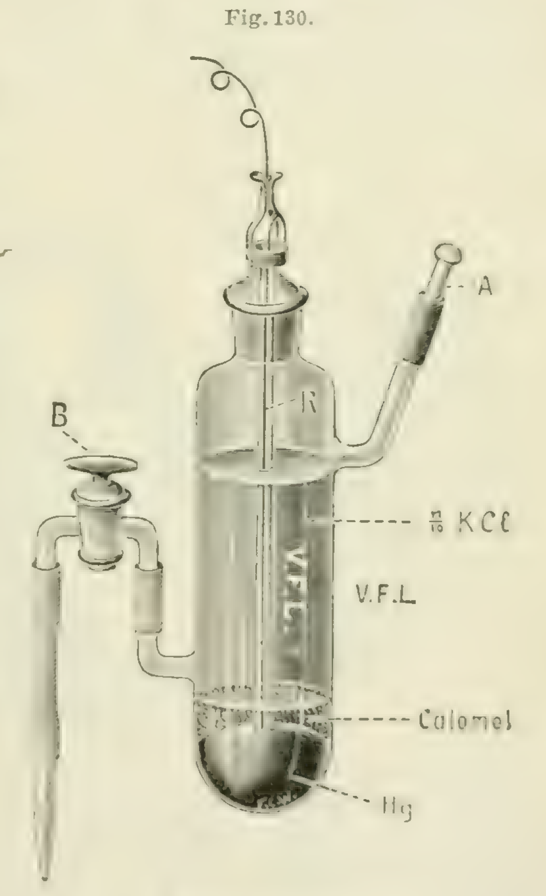
Die Kalomelelektrode.

Viel einfacher ist daher die für diesen Zweck von *L. P. S. Sörensen*[1]) eingeführte Dezinormalkalomelelektrode. Sie wird folgendermaßen hergestellt: Das dazu geeignete Elektrodengefäß wird mit absolut reinem Quecksilber so weit gefüllt, daß der an das untere Ende des Rohres *R* eingeschmolzene

[1]) *S. P. L. Sörensen*, Enzymstudien II. Biochem. Zeitschr. S. 131. **21** (1910).

Platinkontakt sicher bedeckt wird. Dann schüttet man eine Messerspitze Kalomel hinein, schüttelt es leicht mit dem Hg durch und füllt das ganze Gefäß mit einer sehr genau hergestellten $\frac{n}{10}$-Lösung von KCl. Dann verschließt man das Gefäß mit dem Glasrohr *R*, welches den Platinkontakt enthält und füllt dieses Rohr mit Quecksilber, in welches der Zuleitungsdraht später hineingesteckt werden kann. Jetzt öffnet man den Hahn *B*, lüftet den Verschluß *A* und läßt die KCl-Lösung etwas ausfließen, bis alle Luftblasen in dem Ableitungsrohr verdrängt sind, schließt dann *B* und *A* wieder. Die Spitze *C* wird in eine Wanne mit gesättigter KCl-Lösung getaucht, wie in Fig. 126 zu sehen ist. Unmittelbar vor der Messung öffnet man den Hahn *B*. Bei Nichtgebrauch ist er sofort wieder zu verschließen. An jedem Untersuchungstage lasse man ein wenig von der KCl-Lösung aus dem Gefäß abfließen. Gelegentlich erneuere man die Füllung. Das Quecksilber braucht nicht erneuert zu werden.

Fig. 130.



Kalomelelektrode.

Das Potential dieser Elektrode gegen die $\frac{1}{1}$ n Wasserstoffelektrode beträgt nach den sehr sorgfältigen Messungen von *Sörensen* bei 18° = 0·3377 Volt.

Findet man z. B., daß die EMK einer Kette, bestehend aus der Versuchselektrode und der Kalomelelektrode als Vergleichselektrode 0·5100 Volt beträgt, so weiß man, daß die Versuchselektrode gegen die $\frac{1}{1}$ n H_2-Elektrode die EMK

$$\begin{array}{r} 0{\cdot}5100 \\ -0{\cdot}3377 \\ \hline =0{\cdot}1723 \end{array} \text{ Volt}$$

betragen würde, welcher Wert dann zur Rechnung benutzt wird.

Die Kalomelelektrode hat den großen Vorteil, daß sie stets fertig zur Untersuchung ist und man die Einleitung des H_2 und die öfters notwendige Instandsetzung der Platin-H_2-Elektrode wenigstens an der Vergleichselektrode spart, und daß ferner das Diffusionspotential gegen jede beliebige KCl-Lösung = 0 ist. Sie hat ferner den Vorteil, daß bei noch so hoher H˙-Konzentration der Versuchslösung keine Umkehr der Stromrichtung eintritt und man auf die Stromrichtung überhaupt nicht mehr zu achten hat, sobald alles einmal richtig montiert ist.

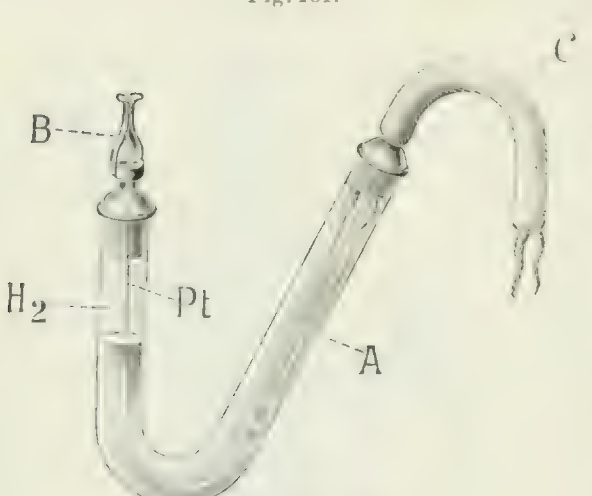
Die Gaselektrode.

Die Gaselektrode, welche zur Aufnahme der zu untersuchenden Flüssigkeit dient, hat nach meinen Erfahrungen am besten und einfachsten folgende Anordnung (Fig. 131):

Sie besteht aus dem Glasgefäß *A*, der Elektrode *B* und dem Schlauch *C*. Die Elektrode wird am besten nicht durch ein Platinblech, sondern einfach durch einen Platindraht dargestellt, welcher in einen Glasschliff eingeschmolzen ist. Oben trägt der Glastubus einen federnden Kontakt zur Ableitung des Stromes.

Der Platindraht muß mit Platinschwarz überzogen werden. Man reinige das Platin zunächst mit konzentrierter Salpetersäure und wasche diese mit Wasser ab. Von jetzt an darf das Platin nicht mehr mit dem Finger berührt werden. Nunmehr verbinde man die Platinelektrode mit dem negativen Pol eines Akkumulators (oder auch einer Batterie von zwei hintereinander geschalteten Akkumulatoren), während man die feste Platinelektrode des „Platinierungsgefäßes" mit dem positiven Pol verbindet. Das Gefäß wird mit einer Lösung von 3% Platinchlorid + einer minimalen Spur Bleiazetat gefüllt und der Strom durchgeleitet. Unter häufigem Drehen der Elektrode lasse man den Strom hindurchgehen. Das Platin überzieht sich mit einer sammetschwarzen Schicht von Platinschwarz. Sobald dieser Bezug allseitig und gleichmäßig geworden ist, ist die Platinierung beendet. Die Platinierung einer ganz neuen Elektrode geschieht oft langsam und erfordert bis 5 Minuten, alle späteren Platinierungen der Elektrode erfordern gewöhnlich nur 1—2 Minuten. Jetzt spüle man die Elektrode gut mit destilliertem Wasser ab und unterwerfe sie sofort einer kathodischen Polarisation. Das hat den Zweck, die dem Platinschwarz noch anhaftenden Reste von Platinchlorid zu reduzieren. Das ist unbedingt notwendig. Zu diesem Zweck benutzt man genau die gleiche Anordnung wie beim Platinieren, nur fülle man das Gefäß nicht mit der Platinlösung, sondern mit verdünnter Schwefelsäure. Man lasse die Gasentwicklung einige Minuten vor sich gehen, spüle die Elektrode gut ab und bewahre sie bis zum Gebrauch unter destilliertem Wasser einfach in dem Elektrodenrohr (Fig. 131) auf. Die Elektrode ist wenige Minuten nach dieser Prozedur sofort gebrauchsfähig; das an manchen Orten vorgeschriebene 24stündige Wässern ist nach guter Reduktion ganz überflüssig.

Fig. 131.



Wasserstoffelektrode.

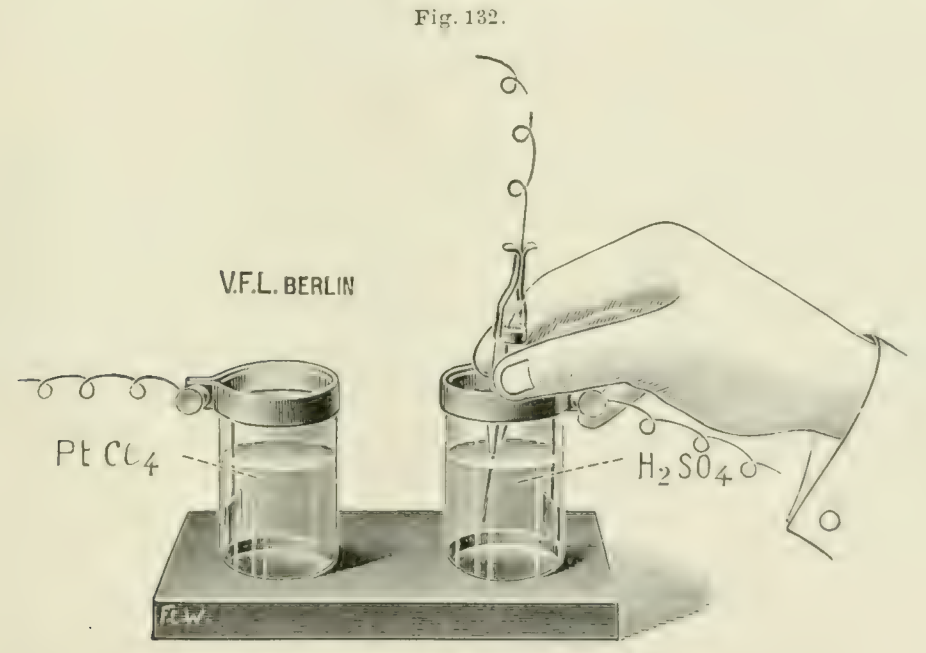
Die Platinierung muß von Zeit zu Zeit erneuert werden. Wird die Elektrode immer nur mit eiweißfreien Lösungen gefüllt, so hält sie sich oft viele Wochen lang gut. Im anderen Fall kann es vorkommen, daß die Platinierung alle paar Tage notwendig wird.

Die fertig platinierte Elektrode wird erst auf ihre Güte geprüft. Dies geschieht am einfachsten, indem man eine Lösung von genau bekannter H·-Konzentration mit ihr mißt. Als solche Vergleichslösung empfehle ich:

10 cm^3 n NaOH
20 „ n Essigsäure
70 „ dest. Wasser.

Die Platinelektrode muß gegen die Kalomelelektrode bei 18° C die EMK 0·6045 Volt[1]) haben. Mehr als höchstens ±0·001 Volt Differenz

Fig. 132.



Platinierungs- und Reduktionsgefäß.

ist eigentlich unstatthaft, obwohl für die allermeisten Zwecke eine Abweichung von 0·002 bis 0·003 Volt noch gar nicht in Betracht kommt.

Bei längerem Gebrauch wird die Elektrode schlecht. Man bemerkt das daran, daß ganz plötzlich unmögliche Resultate herauskommen. Kleine Fehler macht die Platinelektrode nicht so leicht; wird sie schlecht, so gibt sie sofort ganz unwahrscheinliche Resultate. Auch kommt es vor, daß eine Verschlechterung der Elektrode sich dadurch anzeigt, daß sie zur

[1]) Für andere Temperaturen ist dieser Wert noch nicht mit dem gleichen Grad von Genauigkeit festgelegt. Mit praktisch genügender Genauigkeit kann man aber bis zu etwa 24° C pro Grad 0·8 Millivolt zuziehen, so daß die EMK dieser Kette beträgt:

bei 18° . . . . 0·6045 Volt
„ 20° . . . . 0·6061 „
„ 22° . . . . 0·6078 „
„ 24° . . . . 0·6093 „

Einstellung eines konstanten Potentials ungebührlich lange Zeit braucht, also etwa mehr als eine Stunde.

Zum Gebrauch füllt man die Elektrode zunächst mit der zu untersuchenden Lösung, ohne eine Luftblase in dem Elektrodenschenkel zu lassen. Dann fülle man diesen mit Wasserstoffgas. Dieses wird entweder in einem elektrolytischen Wasserstoffentwickler oder im *Kipp*schen Apparat entwickelt. Man wasche den H_2 mit Kaliumpermanganatlösung zur Oxydation oxydabler Gase und mit gesättigter $HgCl_2$-Lösung zur Entfernung des Arsens. Der Wasserstoff muß natürlich absolut frei von Luft sein. Man lasse den Wasserstoff längere Zeit durch ein kapillar-ausgezogenes Glasrohr strömen, führe dies während des Durchströmens in den offenen Schenkel des Elektrodengefäßes, schließe dann mit einem Quetschhahn den H_2-Strom und führe die Glaskapillare so tief ein, daß der dann zuzuleitende Wasserstoff in dem kürzeren Schenkel des Elektrodengefäßes aufsteigt. Man lasse langsam soviel Wasserstoffgasblasen hinzu, bis die Platinelektrode nur mit der äußersten Spitze noch in die Flüssigkeit taucht.

Der Umstand, daß die Platinelektrode sich erst allmählich mit H_2-Gas sättigt, hat zur Folge, daß die EMK nicht sofort nach Ansetzung der Gaskette den definitiven richtigen Wert hat. Ist die Vergleichselektrode die Kalomelelektrode, so wird die EMK der Kette im Laufe der Zeit zunächst stets zunehmen, bis schließlich die Konstanz erreicht ist. Man mache gleich nach Ansetzung der Kette eine Messung der EMK, wiederhole diese etwa alle 10 Minuten und betrachte den Wert nicht eher als den definitiven, bis sich in drei aufeinanderfolgenden Ablesungen im Zwischenraum von 10 Minuten absolut keine Änderung der EMK mehr zeigt.

Die Angaben in den Büchern, man solle die Elektrode zu einem Drittel ihrer Länge eintauchen lassen, sind ganz unzweckmäßig. Die Einstellung des richtigen Potentials geschieht viel schneller, wenn die Elektrode nur noch knapp eintaucht.

Bei eiweißhaltigen Flüssigkeiten, in denen der H_2 in Blasen stehen bleibt, lasse man so viel H_2 hinein, daß die Elektrode nicht mehr ganz eintaucht. Die kapillare Stromleitung an den Wänden der Wasserstoffbläschen ist hinreichend.

Die Ursache dieser Erscheinung scheint mir folgende zu sein: Potentialbestimmend kann nur der eintauchende Teil der Elektrode sein. Der definitive Wert des Potentials wird erreicht, sobald dieser eintauchende Teil der Elektrode mit Wasserstoffgas gesättigt ist. Der Wasserstoff gelangt aber in diesen Teil der Elektrode nicht direkt aus dem Gasraum, mit dem er ja nicht in offenem Austausch steht, sondern durch Diffusion aus dem aus der Flüssigkeit herausragenden Teil der Platinelektrode. Der Diffusionsweg des absorbierten Wasserstoffes aus dem überstehenden in den eintauchenden Teil des Platins ist aber um so kürzer, je kürzer der eintauchende Teil ist. Daher wird sich eine nur knapp eintauchende Elektrode schneller mit H_2 sättigen als eine tiefeintauchende.

Eine besondere Schwierigkeit bietet die Untersuchung von Flüssigkeiten, die Gase gelöst enthalten, wie CO_2, O_2, NH_3, Cl_2, N_2. Wir müssen hier zwei Fälle unterscheiden, entweder ist das betreffende Gas „elektromotorisch wirksam" oder nicht. Den ersten Fall stellt z. B. Cl_2 dar. Füllen wir das Elektrodengefäß mit einer Cl_2 entwickelnden Flüssigkeit und füllen in üblicher Weise Wasserstoffgas ein, so wird sich der Gasraum und schließlich auch das Platin mit etwas Cl_2 beladen. Wir haben somit nicht mehr eine reine H_2-, sondern gleichzeitig eine Cl_2-Elektrode vor uns, und für die Größe des Potentials wird nicht allein die Konzentration der gelösten H'-Ionen, sondern auch die der Cl'-Ionen maßgebend sein. In einem solchen Fall gibt uns daher die EMK der Kette gar keinen Aufschluß über die Konzentration der H'-Ionen. Besonders wichtig ist die in der physiologischen Literatur überhaupt noch nicht bekannte Tatsache, daß auch NH_3-Gas elektromotorisch wirksam ist. Man kann daher Flüssigkeiten, die NH_3-Gas entwickeln, nicht mit Gasketten messen. Den zweiten Fall stellt eine Flüssigkeit dar, welche z. B. CO_2 gelöst enthält wie Blut. CO_2 ist, wie *Höber* nachgewiesen hat, elektromotorisch gar nicht wirksam und ein dem vorigen Beispiel analoger Fehler kann daher nicht entstehen. Dafür entstehen zwei andere Fehler: 1. Durch das Entweichen der Kohlensäure in den Gasraum aus der Flüssigkeit nimmt die Azidität der Flüssigkeit allmählich ab, so daß nach Einstellung eines konstanten Potentials nicht die ursprüngliche, sondern eine sekundär veränderte H-Ionenkonzentration gemessen wird. 2. Durch die Aufnahme von CO_2 wird der Partialdruck des H_2 in dem Gasraum geringer und damit die Potentialdifferenz geändert. Denn unsere Vergleichselektrode ist eine solche, welche H_2 unter 1 Atmosphäre Druck enthält. Der hierdurch verursachte Fehler ist allerdings nicht groß, denn der „elektrolytische Lösungsdruck" eines zweiatomigen Gases, wie H_2, ist nur der Quadratwurzel aus dem Gasdruck proportional; daher ist es fast belanglos, ob der Wasserstoffatmosphäre einige Prozente CO_2 beigemengt sind oder nicht.

Durch diese Mitwirkung der CO_2 kommt es nun, daß die genaue Bestimmung der H-Ionenkonzentration in physiologischen Flüssigkeiten besondere Schwierigkeiten macht. Neuerdings ist es *Hasselbach*[1]) gelungen, auch diese Schwierigkeit zu beseitigen. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß er mit Hilfe eines besonders konstruierten Gefäßes zunächst die Gaselektrode wie gewöhnlich zusammensetzt, durch Schütteln den Gasaustausch zwischen der Flüssigkeit und dem Gasraum bis zum eintretenden Gleichgewicht herbeiführt und schließlich die so veränderte Flüssigkeit durch eine frische Probe ersetzt unter Innehaltung des alten Gasraumes. Jetzt kann die Flüssigkeit keine CO_2 mehr abgeben und der erste Fehler, den die CO_2 bewirkt, ist ausgeschaltet. Der zweite Fehler war ja, wie wir sahen, zu vernachlässigen.

[1]) *K. A. Hasselbach*, Elektrometrische Reaktionsbestimmung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten. Biochem. Zeitschr. Bd. 30. 3/7. (1910.)

Die mit dieser Methode erhaltenen Werte weichen nur sehr wenig von der der gewöhnlichen Methode ab, sobald man mit dem von mir angegebenen Kunstgriffe des geringen Eintauchens der Elektrode arbeitet und man mit einer Elektrode arbeitet, die sich erfahrungsgemäß schnell zur Konstanz einstellt. Je kleiner das Volumen des Gasraumes ist, um so kleiner ist der CO_2-Fehler. Man kann nun aber ohne Bedenken mit ganz kurzen Platindrahtelektroden arbeiten, so daß der Gasraum weniger als 1 *cm*³ beträgt. Wenn man dann den etwa nach Ablauf der ersten halben Stunde gemessenen Wert als den richtigen betrachtet, so wird man keinen merklichen Fehler machen. Man muß nämlich bedenken, daß die Definierung der Wasserstoffionenkonzentration in physiologischen Flüssigkeiten keine sehr scharfe ist, und daher auch die Beanspruchung der allerhöchsten Genauigkeit nicht in der Natur der Sache begründet ist. So kann z. B. ein Blutserum, welches mit der Luft in Berührung steht, in kurzer Zeit durch Abgabe von CO_2 seine $[H^{\cdot}]$ erheblich mehr ändern, als der Ungenauigkeit der gewöhnlichen Messung entspricht. Immerhin gibt die Methode von *Hasselbach* ein Mittel an die Hand, gegebenenfalls die äußerste Genauigkeit zu erreichen, wenn die Umstände es lohnend erscheinen lassen.

Die zu messenden Flüssigkeiten dürfen ferner kein Toluol oder Chloroform enthalten, welches die Platinoberfläche „vergiftet" und zu falschen Werten Anlaß geben kann, aber nicht muß, worüber *Sörensen* (l. c.) genaue Untersuchungen angestellt hat. Mit Thymol gesättigte, kein überschüssiges, festes Thymol enthaltende Flüssigkeiten geben dagegen nach meinen Erfahrungen richtige Werte.

Spuren von H_2S, die in eiweißhaltigen Lösungen durch Fäulnis entstehen, vereiteln ebenfalls die Messungen, nach *Sörensen.*

Die Berechnung der Wasserstoffionenkonzentration $[H^{\cdot}]$ bzw. des Wasserstoffexponenten p_H aus der EMK.

Zunächst muß die Temperatur festgestellt werden, bei welcher die Messung stattgefunden hat. Es ist im allgemeinen nicht notwendig, die ganze Apparatur durch ein Wasserbad auf eine gewünschte konstante Temperatur zu bringen, sondern es genügt durchaus, bei Zimmertemperatur zu arbeiten und nach Einstellung eines konstanten Wertes der EMK nachträglich die Temperatur in der Flüssigkeit der Gaselektrode oder der Kalomelelektrode mit einer Genauigkeit von $\pm 0{\cdot}25^{\circ}$ festzustellen. Es empfiehlt sich am meisten, bei einer Temperatur von etwa 18° zu arbeiten, weil die Standardwerte für diese Temperatur am sichersten festgelegt sind.

Ist die EMK der Gaskette (nach Abzug des etwaigen Diffusionspotentials) gegen irgend eine Vergleichselektrode festgestellt, so berechnet

man zunächst die reduzierte EMK, d. h. diejenige EMK, welche bei Benutzung der $\frac{1}{1}$ n . H_2-Elektrode erhalten worden wäre. Ist die Vergleichselektrode irgend eine H_2-Elektrode, so muß man zunächst die $H^{\cdot}$-Ionenkonzentration derselben genau kennen. Bei einer HCl-Lösung ist nun die $[H^{\cdot}]$ gleich der Konzentration der HCl-Lösung, multipliziert mit dem Dissoziationsgrad, α, derselben. Dieser hängt ab von der Gesamtkonzentration des gelösten Cl; wenn man also z. B. eine Lösung von 0·01 n . HCl und 0·09 n . NaCl hat, so ist der Dissoziationsgrad der Salzsäure nicht derjenige einer 0·01 n reinen HCl, sondern gleich dem einer 0·1 n reinen HCl-Lösung. Folgende Tabelle gibt α für verschiedene Cl'-Konzentrationen an:

Konzentration von Cl (in Normalität oder Mol pro Liter)	α
1	0·78
0·1	0·91
0·01	0·96
0·001	0·98.

Beispiel: Die Vergleichslösung sei

0·01 HCl + 0·1 NaCl.

Die Cl-Ionenkonzentration ist 0·11, also sehr annähernd 0·1, daher $\alpha = 0·91$ und $[H^{\cdot}] = 0·0091$ normal.

Gewöhnlich wird man sich aber der $\frac{n}{10}$ Kalomelelektrode als Vergleichselektrode bedienen, und in diesem Fall findet man aus der gemessenen EMK die Potentialdifferenz gegen die n . H_2-Elektrode einfach durch Subtraktion von 0·3377 Volt.

Hat man auf diese Weise die Potentialdifferenz E gegen die n . H_2-Elektrode festgestellt, so findet man aus ihr $[H^{\cdot}]$ durch die Anwendung der Gleichung

$$\log [H^{\cdot}] = -\frac{E}{0·0001983\ T}.$$

Hier bedeutet T die absolute Temperatur, also $273^0 + t$, wo t die Temperatur in Celsiusgraden ist. Der Faktor 0·0001983 T hat folgenden Wert:

für t = 16° Celsius	0·0573
17°	0·0575
18°	0·0577
19°	0·0579
20°	0·0581
21°	0·0583
22°	0·0585
23°	0·0587
24°	0·0589
25°	0·0591

Es sei z. B. EMK gemessen $= 0{\cdot}5377$ Volt bei $17{\cdot}5^{0}$ C., also E gefunden $= 0{\cdot}2000$ Volt, so ist

$$\log [H^{\cdot}] = -\frac{0{\cdot}2000}{0{\cdot}0576} = -3{\cdot}47$$
$$= 0{\cdot}53 - 4$$
$$[H^{\cdot}] = 3{\cdot}39 \, . \, 10^{-4}.$$

Statt des Numerus kann man aber auch den Logarithmus selbst als Maß für die Azidität angeben, und zwar, da dieser in allen für die Physiologie in Betracht kommenden Fällen negativ ist, ohne das Minuszeichen, da ein Mißverständnis nicht möglich ist. Diesen Logarithmus ohne das Minuszeichen nennt *Sörensen* den Wasserstoffexponenten, p_H.

Es entspricht demnach z. B.

p_H		$[H^{\cdot}]$
1·00	. . . .	$1{\cdot}0 \, . \, 10^{-1}$
2·70	. . . .	$2{\cdot}0 \, . \, 10^{-3}$
5·30	. . . .	$5{\cdot}0 \, . \, 10^{-6}$.

In der Tat ist der Wasserstoffexponent ein sehr bequemes Maß für die Azidität, erstens weil seine Schreibweise sehr bequem ist, und zweitens, weil sehr viele chemische Reaktionen zu dem Wasserstoffexponenten, also dem Logarithmus von $[H^{\cdot}]$ in einer einfacheren Beziehung stehen, als zu der Wasserstoffionenkonzentration selbst.

Der Sicherheit halber muß man bei genauen Messungen stets zwei gleiche Gaselektroden a und b und vor allem zwei Kalomelelektroden A und B benutzen. Man mißt die Potentialdifferenzen

a — A
a — B
b — A
b — B

und muß in allen vier Fällen identische Werte erhalten, womöglich bis auf 0·5 Millivolt übereinstimmend. Aber auch Abweichungen bis zu 2 und selbst 3 Millivolt geben noch so geringe Unterschiede, daß man sich meist mit diesem Grad der Genauigkeit begnügen kann.

Versuchsbeispiel.[1])

Es sei die Aufgabe gestellt, mit Hilfe der Kalomelelektrode als Vergleichselektrode in folgender Lösung die H-Ionenkonzentration x zu messen:

normal NaOH	. . . .	10 cm^3
normal Essigsäure	. . . . .	20 cm^3
Wasser	. . . .	70 cm^3.

[1]) Ich empfehle dem Anfänger die praktische Ausführung gerade dieses Beispieles.

Wir setzen die Kette an und finden bei 18° C

sofort die EMK	= 0·6000	Volt
nach 10 Minuten	0·6030	„
„ 20 „	0·6045	„
„ 30 „	0·6045	„
„ 2 Stunden	0·6045	„
„ 8 „	0·6045	„
„ 24 „	0·6045	„

Der endgültige Wert ist also 0·6045.

Wir ziehen zunächst die Potentialdifferenz der Kalomelelektrode gegen die Normal-H_2-Elektrode, 0·3377 Volt, ab und finden

$$\begin{array}{r} 0{\cdot}6045 \\ -0{\cdot}3377 \\ \hline E = 0{\cdot}2668 \text{ Volt} \end{array}$$

als EMK unserer Elektrode gegen $\frac{1}{1}$-Normal-H_2-Elektrode.

Nun ist $E = 0{\cdot}0001983 \,.\, T (\log 1 - \log x)$ oder, da $\log 1 = 0$,

$$E = -0{\cdot}0001983 \,.\, T \,.\, \log x$$

oder nach $\log x$ aufgelöst,

$$\log x = -\frac{E}{0{\cdot}0001983 \,.\, T}$$

T ist in unserem Fall, wo die Temperatur 18° C betrug, 273 + 18 = 291, und E = 0·2668, also

$$\log x = -4{\cdot}624$$
$$\text{oder } \log x = 0{\cdot}376 - 5$$
$$\text{also } x = 2{\cdot}38 \,.\, 10^{-5}.$$

Wir finden also für unsere Flüssigkeit:

$$p_H = 4{\cdot}62$$
$$\text{und } [H^{\cdot}] = 2{\cdot}38 \,.\, 10^{-5}.$$

Von Interesse ist nun die Feststellung, welchen Einfluß ein kleiner Fehler in der Bestimmung der EMK auf den Ausgang der Rechnung hat. Man kann sagen, daß unter Bedingungen, wie sie in physiologischen Arbeiten gegeben sind, die Genauigkeit der Bestimmung der EMK mitunter nur auf ± 0·003 Volt möglich ist. In unserem Fall würde also der gefundene Wert von 0·6045 ungenau sein bis auf ± 3 Millivolt. Bei EMK = 0·6075 würde sein

$$p_H = 4{\cdot}676$$
$$[H^{\cdot}] = 2{\cdot}11 \,.\, 10^{-5}$$

und bei EMK = 0·6015 würde sein

$$p_H = 4{\cdot}568$$
$$[H^{\cdot}] = 2{\cdot}70 \,.\, 10^{-5}.$$

Es ist also, bei einem Spielraum der EMK von ± 3 Millivolt, die Genauigkeit der Bestimmung von $p_H = \pm 0{\cdot}05 - 0{\cdot}06$,

von $[H^{\cdot}] = \pm 10\%$ bis 15% des Gesamtwertes.

In der soeben gemessenen Flüssigkeit läßt sich nun auch die H·-Konzentration durch Berechnung bestimmen, und wir haben hier eine gute Kontrolle für die Zuverlässigkeit der Messung. Die Flüssigkeit stellt nämlich ein Gemisch von gleichen (molaren) Teilen Natriumazetat und Essigsäure dar, und in einer solchen ist nach S. 1341 in Bd. III dieses Handbuchs

$$[H^{\cdot}] = \frac{k \, . \, [\text{Essigsäure}]}{\varkappa \, . \, [\text{Natriumazetat}]}.$$

Die Dissoziationskonstante der Essigsäure, k, ist bei 1° = 18·86 . 10⁻⁵ (vgl. Bd. III, S. 1339) der Dissoziationsgrad des Natriumazetats in einer $\frac{n}{10}$-Lösung, wie sie hier vorliegt, ist 0·78. Daraus berechnet sich

$$[H^{\cdot}] = 2{\cdot}38 \, . \, 10^{-5} \text{ oder } p_H = 4{\cdot}62$$

während gefunden wurde: $2{\cdot}38 \, . \, 10^{-5}$ oder $p_H = 4{\cdot}62$.

Obige Flüssigkeit wurde auf meine Veranlassung in entgegenkommendster Weise von *Sörensen* und *Koföd* und gleichzeitig von mir bei 18° gemessen. In sehr zahlreichen Versuchen wurde von uns in übereinstimmender Weise der obige Mittelwert gefunden, mit einer Abweichung der einzelnen Versuche vom Mittel im Betrage von höchstens ± 0·6 Millivolt. Der Wert darf daher als ein zuverlässiger Standardwert betrachtet werden, der dazu geeignet ist, die Potentialdifferenz der $\frac{1}{10}$ n Kalomelelektrode gegen die n . H_2-Elektrode festzulegen. Es würde sich auf Grund dieser EMK ergeben: 0·3378 Volt, in schönster Übereinstimmung mit dem *Sörensen*schen Werte 0·3377 Volt.

Die Arbeitsmethoden bei Versuchen über Anaphylaxie.

Von **Hermann Pfeiffer**, Graz.

Einleitende Vorbemerkungen (zugleich Terminologie).

Man versteht unter (aktiver) Anaphylaxie (Synonyme: Allergie, Überempfindlichkeit) jenen spezifischen, durch das Vorhandensein von Antieiweißkörpern bedingten Ausnahmszustand, in welchem nach erstmaligem parenteralen Eindringen und Zerfall von artfremdem oder aber artgleichem und dann blutfremdem Eiweiß die Versuchstiere gegen die neue Einbringung eben dieses Eiweißkörpers und keines anderen eine erhöhte Empfindlichkeit erwerben. Das erste Eindringen von Überempfindlichkeit erzeugendem Eiweiß wird Sensibilisierung (bzw. erste Injektion), das Eiweiß selbst Sensibilisinogen (synonym Anaphylaktogen, Eiweiß oder Antigen der Vorbehandlung) genannt. Das erste Eindringen erfolgt durch parenterale Injektion, oder durch künstliches, oder endlich durch spontanes Zugrundegehen von körpereigenem, aber blutfremdem Eiweiß. Während die erste Injektion, ohne dem Tiere Schaden zu tun, ertragen wird, erkrankt oder stirbt es bei der zweiten (der sogenannten Probeinjektion) unter den typischen Symptomen des anaphylaktischen Shocks. Es ist demnach das Auftreten des anaphylaktischen Shocks unter Versuchsbedingungen, die normale Tiere nicht, oder in nennenswertem Ausmaße schwächer oder aber in prinzipiell anderer Weise schädigen, das erste und wichtigste Kriterium des anaphylaktischen Zustandes.

Dieser entwickelt sich erst in längerer Zeit nach der ersten Injektion, ein Zeitraum, welcher durch ein scheinbar normales Verhalten des Tieres charakterisiert ist, sich mit dem geläufigen Begriff der Inkubationszeit deckt und präanaphylaktisches Stadium genannt wird.

Die Krankheitserscheinungen des anaphylaktischen Shocks sind bedingt durch das parenterale Auftreten von giftigen Spaltprodukten der bei der Reaktion beteiligten Eiweißkörper. Man nennt dieses fertig gebildete, an sich wirksame Gift Anaphylaxiegift (synonym Anaphylatoxin). Es entsteht durch den Zusammentritt dreier wesentlicher Faktoren: des im überempfindlichen Tiere gebildeten Antieiweiß (synonym anaphylaktischer Reaktionskörper), des in ihm schon normalerweise disponiblen

Komplements und des reinjizierten Antigens. Die Giftbildung erfolgt im Sinne einer fermentativen Aufspaltung unter Bildung von Produkten mit Peptoncharakter, und zwar auf Kosten des eingebrachten Antigens, wahrscheinlich aber auch auf Kosten des lebenden tierischen Eiweiß.

Das Überstehen eines Shocks schafft bei dem überempfindlichen Tiere und zwar durch Verbrauch des Antieiweiß ein refraktäres Verhalten gegen eine neuerliche Einverleibung des Antigens der Vorbehandlung, die sogenannte Antianaphylaxie. Diese kann vollständig oder komplett, unvollständig oder partiell sein, d. h. ein Tier erkrankt im antianaphylaktischen Zustande gar nicht mehr (komplette) oder weitaus schwächer (partielle Antianaphylaxie) — gleiche Versuchsbedingungen vorausgesetzt —, als im anaphylaktischen Shock.

Die Antianaphylaxie ist spezifisch und gleichfalls ein exaktes Kriterium einer überstandenen Überempfindlichkeit, wenn nachgewiesen werden kann, daß ein Tier gegen Antigenmengen unempfindlich geworden ist, gegen welche es innerhalb gewisser zeitlicher Grenzen mit einem anaphylaktischen Shock reagiert hatte.

Dabei muß aber dieser in seiner Wesenheit in zureichender Weise an normalen Kontrollen sichergestellt, die tatsächlich entwickelt gewesene Überempfindlichkeit einwandfrei erhärtet sein. Denn es schafft auch das Überstehen anderer toxischer Einwirkungen — so z. B. eine Vergiftung mit Pepton oder mit den Hämolysinen normaler Tiere oder mit toxischem Harn — ebenso wie der anaphylaktische Shock einen Zustand verminderter Reaktionsfähigkeit gegen ein an sich toxisches Agens. Diese ist unspezifisch, ihrer Natur nach noch nicht geklärt, jedenfalls aber im Gegensatz zur reinen Antianaphylaxie nicht bedingt durch Verbrauch und Schwund des immunisatorisch gebildeten Antieiweiß. Wir haben deshalb zwischen zwei, jedem anaphylaktischen Zustande folgenden Erscheinungen zu unterscheiden: 1. zwischen der Antianaphylaxie (sensu strictiori!), d. i. die Aufhebung der Reaktionsfähigkeit eines anaphylaktisch gewesenen Tieres infolge des im anaphylaktischen Shock erfolgten Verbrauches von Antieiweiß; sie ist spezifisch und 2. zwischen der verminderten Reaktionsfähigkeit antianaphylaktischer Individuen. Sie äußert sich in einer Unempfindlichkeit solcher Tiere gegen an sich toxische Agenzien bestimmter Art (Eiweißzerfallsgifte). Sie ist nicht spezifisch.

Der Zustand der Antianaphylaxie führt nicht unmittelbar in den normalen Zustand über, sondern es entwickelt sich in ihrem Gefolge durch die Anwesenheit von anaphylaktogen wirkendem Eiweiß nach längerer oder kürzerer Zeit neuerlich eine Überempfindlichkeit, die dann bei ungestörtem Verlauf nach Monaten oder Jahren zur Norm führt.

Eine aktive Anaphylaxie läßt sich passiv durch parenterale Einbringung eines Serums eines überempfindlichen Tieres in genügenden Mengen auf ein sonst unvorbehandeltes normales Tier übertragen, sogenannte passive Anaphylaxie. Sie kann nicht nur von einem Tier auf ein anderes derselben Art (homologe), sondern auch mancher anderen Tierart über-

tragen werden (heterologe passive Anaphylaxie). Diese Übertragung nennt man passive Sensibilisierung. In ihrem Gefolge verankert sich nach den heute geltenden Anschauungen der auf das normale Tier übertragene Immunkörper in diesem rasch. Nach seiner Verankerung kann durch Reinjektion des Eiweiß, mit welchem die aktive Anaphylaxie erzeugt wurde, ein anaphylaktischer Shock und alle weiteren Erscheinungen in ganz derselben Weise beobachtet werden, wie dies für die aktive Überempfindlichkeit beschrieben wurde.

Nach dem Erörterten ergibt sich für die Behandlung der Methodik von Versuchen über Anaphylaxie die folgende Stoffeinteilung:

1. Die Kriterien des anaphylaktischen Shocks:
   a) Krankheitserscheinungen und Tod;
   b) die pathologisch-anatomischen Veränderungen.
2. Der Nachweis einer aktiven Anaphylaxie:
   a) Sensibilisierung;
   b) die Reinjektion;
   c) die Maßmethoden des anaphylaktischen Shocks;
   d) die Differentialdiagnose des anaphylaktischen Shocks gegenüber verwandten oder wesensgleichen, aber nicht anaphylaktischen Vergiftungsbildern.
3. Der Nachweis einer homologen und heterologen passiven Anaphylaxie:
   a) die Sensibilisierung;
   b) die Reinjektion;
   c) die Maßmethoden des anaphylaktischen Reaktionskörpers.
4. Der Nachweis einer Antianaphylaxie (Differentialdiagnose gegenüber der verminderten Reaktionsfähigkeit).
5. Der Nachweis organspezifischer anaphylaktischer Reaktionen:
   a) mit heterologem und mit homologem Eiweiß;
   b) mit körpereigenem Eiweiß.
6. Der Nachweis von Anaphylatoxin.
7. Der Nachweis des spezifischen Abbauvermögens mit Seren anaphylaktischer Tiere:
   a) durch Peptonbildung in den Gemischen;
   b) durch Änderung des Drehungsvermögens der Gemische.

1. Die Kriterien des anaphylaktischen Shocks.

a) Die Krankheitserscheinungen: Sie sind bei dem klassischen Versuchstiere, beim Meerschweinchen, ihrem Wesen nach verschieden, je nachdem, ob die Bedingungen zu einer rasch tödlich verlaufenden oder zu einer protrahierteren tödlichen oder in Genesung ausgehenden Erkrankung gegeben sind, mit anderen Worten, ob in der Zeiteinheit größere oder kleinere Giftmengen parenteral frei werden und zur Wirkung gelangen. Dies hängt von den Versuchsvoraussetzungen ab. Bei intravenöser Re-

injektion kompakter Dosen werden bei hoch sensibilisierten Tieren stürmische Reaktionen, bei intravenöser Applikation kleiner und verdünnter Eiweißmengen oder bei intraperitonealer sowie subkutaner Injektion die Erscheinungen der zweiten Kategorie erwartet werden dürfen.

Das letztere gilt für an sich unempfindlichere Tierarten (wie z. B. für den Hund) oder für ungenügend sensibilisierte Meerschweinchen und Kaninchen fast ausnahmslos.

α) Die Wirkung großer Dosen von der Blutbahn aus (der perakute Krankheitsverlauf): Zur Zeit einer voll entwickelten Anaphylaxie sterben mit kompakten, an sich ungiftigen Antigendosen reinjizierte Meerschweinchen ganz plötzlich, oft blitzartig (*Theobald Smith*sches Phänomen[1]). Die Meerschweinchen verfallen zunächst in eine hochgradige Exaltation, ohne aber daß diese, wie bei Hunden, in eine lang dauernde Depression übergehen würde. Sie zeigen vielmehr eine plötzlich einsetzende schwerste Dyspnoe, Singultus, lebhafte periphere Krämpfe, die sich insbesondere auf die Brustmuskeln, das Zwerchfell und die exspiratorischen Bauchmuskeln lokalisieren und gehen in wenigen Minuten unter krampfartigen Respirationsbewegungen und Zyanose zugrunde. Dabei tritt zunächst kein Abfall, sondern ein deutlicher Anstieg des Blutdruckes auf, der dann rasch mit eintretendem Tode bis zur Abszisse abfällt. Eine Erholung von dem tiefen Druckniveau kann hier niemals, eine subakute, durch Stunden währende Erkrankung der Tiere bei dieser Versuchsanordnung nur ganz ausnahmsweise beobachtet werden. Die Temperatur ganz plötzlich zugrunde gegangener Tiere sinkt, wie eigene Erfahrungen gelehrt haben, nur um 1—2° unter die Norm vor dem Tode ab.

Wie Untersuchungen von *Auer* und *Lewis*[2]), *Biedl* und *Kraus*[3]) ergaben, sind diese Erscheinungen bedingt durch einen toxischen Krampf der Bronchialmuskulatur, so daß trotz ausgiebiger Respirationsbewegungen kein Luftaustausch in den Lungen stattfinden kann. Der Tod tritt in solchen Fällen jedenfalls durch Erstickung, nach den nicht unwidersprochen gebliebenen Angaben der genannten Autoren infolge einer toxischen, bis zum Tetanus führenden Reizung der Bronchialmuskeln ein.

β) Die Folgen einer intravenösen Injektion kleiner verdünnter Serummengen bzw. einer intraperitonealen Einverleibung. Wesentlich anders verläuft der anaphylaktische Shock sowohl in seiner äußeren Erscheinung, als auch essentiell unter den eben genannten Versuchsbedingungen, wie viele hunderte einschlägige Erfahrungen uns auch in Gemeinschaft mit *S. Mita*[4]) gelehrt haben.

---

[1]) *Th. Smith*, Degrees of susceptibility to diphtheric-toxin among Guinea-pigs. Journ. of med. Res. 1904. Vol. 22.

[2]) *Auer* und *Lewis*, Acute anaphylaktic death in Guinea-pigs. Journ. of the Americ. med. Assoc. Vol. 53. 1909. p. 6.

[3]) *Biedl* und *Kraus*, Experimentelle Studien über Anaphylaxie. Wiener klinische Wochenschr. 1910. Nr. 11. S. 844.

[4]) *H. Pfeiffer*, Wiener klin. Wochenschr. 1909. Nr. 1. S. 1. — *H. Pfeiffer* und *S. Mita*, Studien über Eiweiß-Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd. 4. H. 4. S. 410.

Hier werden die Tiere unruhig, laufen ängstlich hin und her, kratzen sich, sind schreckhaft. Ihr Fell sträubt sich, es treten einzelne klonische Zuckungen auf. Ein lebhafter Singultus und die Entleerung fester, später flüssiger, selbst blutiger Stühle sowie von Harn dauern an. Die Bauchdecken sind prall gespannt, es besteht manchmal ein ausgesprochener Pruritus cutaneus. Dieses vorübergehende Bild einer Erregung leitet aber bald in eine ausgesprochene Depression hinüber, in welcher die Meerschweinchen von großer Mattigkeit und Muskelschwäche befallen werden. Sie legen sich auf die Seite und bleiben so, langsam und tief atmend, durch Stunden hindurch liegen. Intensivere Grade von Dyspnoe, wie sie bei einem ganz akuten Verlaufe regelmäßig eintreten, fehlen hier bis zur Agone völlig. Führt der Shock zum tödlichen Ausgang, so tritt er in der weitaus überwiegenden Mehrzahl der Fälle erst nach 1—2, ja selbst noch nach 8 Stunden ein. In solchen Fällen liegen die Tiere wie bewußtlos mit gelähmten Extremitäten da. Manchmal tritt vorübergehend Dyspnoe auf, regelmäßig bemerkt man aber ante exitum das *Cheyne-Stokes*sche Atmen.

Unter den genannten Versuchsbedingungen steht im Mittelpunkte der anaphylaktischen Krankheitserscheinungen ein ganz enormes Absinken der Körpertemperatur, welches auch in jenen Fällen deutlich ausgesprochen ist, wo klinische Erscheinungen völlig fehlen. Diese spezifische, von *H. Pfeiffer*[1]) als „anaphylaktischer Temperatursturz" beschriebene Schädigung im Wärmehaushalte kann 7—9° in Fällen von Erholung betragen; bei Tieren, welche nach längerer Krankheitsdauer sterben, können bis zum Tode sogar Temperaturdifferenzen von 11—13° unter die Ausgangstemperatur beobachtet werden. Dieses Phänomen kann, wie sich nach Versuchen von *Biedl* und *Kraus*[2]), insbesondere aber nach Versuchen von *E. Friedberger* und *Gröber*[3]) am Kaninchen und Meerschweinchen ergab, kaum anders denn als Ausdruck einer tiefen, hier im Mittelpunkte der Erkrankung stehenden, peripher ausgelösten Blutdrucksenkung aufgefaßt werden.

Blutuntersuchungen während des anaphylaktischen Shocks ergaben beim Hund (*Biedl* und *Kraus*), später aber auch beim Meerschweinchen, daß es seine Gerinnungsfähigkeit einbüßt oder sie doch wesentlich herabgesetzt ist. Gleichzeitig vermindert sich die Zahl der Leukozyten im Sinne einer schweren Leukopenie. Tritt Erholung ein, so schlägt diese in eine ausgesprochene, oft ganz riesige Grade annehmende polynukleäre Leukozytose um, die stunden- und tagelang anhalten kann.

Gehen die Tiere nicht zugrunde, so erholen sie sich rasch aus ihrer Depression, werden wieder munter und freßlustig und zeigen am nächsten Tage, von der eben erwähnten Leukozytose und einer oft sehr ausgespro-

[1]) l. c.

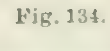
[2]) *Biedl* und *Kraus*, Experimentelle Studien über Anaphylaxie. Wiener klinische Wochenschr. 1909. Nr. 11. S. 363.

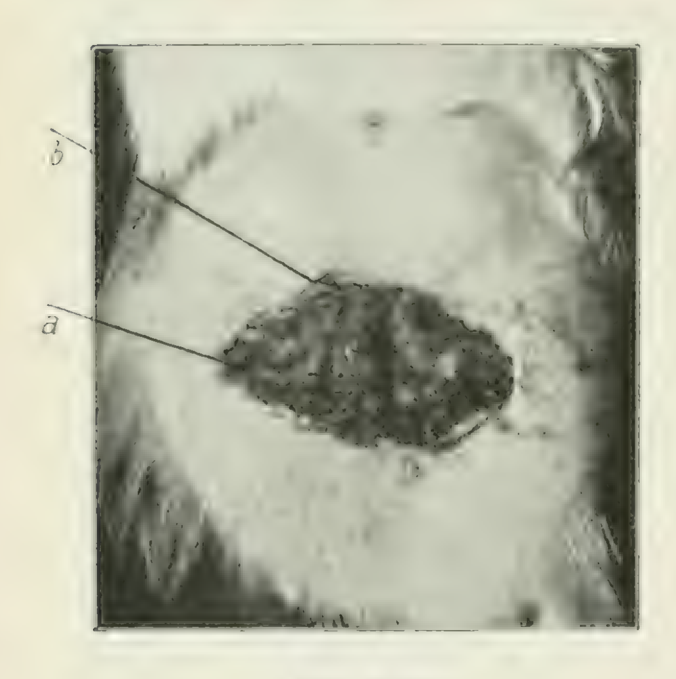
[3]) *E. Friedberger* und *Gröber*, Über Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsf. 1911. Bd. 9. H. 2. S. 216.

chenen Hyperthermie (*E. Friedberger*[1]) abgesehen, keine Krankheitserscheinungen mehr. Nur die hochgradige und spezifische Abnahme ihres Körpergewichtes bildet dann noch einen Ausdruck für die schwere Schädigung, welche sie durchgemacht haben.

γ) Die Folgen intraperitonealer Injektion kleiner und kleinster Dosen von den Leibeshöhlen aus. Kleine Dosen rufen meist auch bei dem so hoch empfindlichen Meerschweinchen keine schweren, sondern nur ganz vage Allgemeinerscheinungen — geringe Mattigkeit, Paresen der Hinterbeine, leichter Singultus — hervor, oder man vermißt solche vollständig. Noch ganz schwache Schädigungen des Versuchstieres

Fig. 133.





Lokale Nekrose.



Geschwürsbildung am Applikationsorte.

spiegeln sich aber dann noch in ausgiebigen Temperaturabfällen wieder, die hier gerade oft das einzig nachweisbare Symptom sein können. Tritt Erholung ein, so kommt es auch hier zu einer ausgesprochenen Leukozytose und Fieber. Wird selbst der kritische Temperaturabfall bei einem Versuchstiere vermißt, so kann (*E. Friedberger*) oft noch ein direkter Fieberanstieg das einzige und feinste Symptom einer anaphylaktischen Erkrankung sein.

δ) Die Folgen subkutaner Injektion. Selbst bei großen Injektionsdosen wird hier, entsprechend den ungünstigeren Resorptionsbedingungen, niemals akuter Exitus (wie unter α beschrieben) beobachtet, wohl aber können mehr minder schwere Allgemeinerscheinungen der übrigen

[1]) *E. Friedberger*, Weitere Mitteilungen über die Beziehungen zwischen Überempfindlichkeit und Infektion. Berliner klin. Wochenschr. 1910. Nr. 42.

Kategorien auftreten. Ganz regelmäßig wird hier aber Fieber und eine polynukleäre Leukozytose, in leichtesten Fällen sogar primär, in schwereren nach einem mehr minder ausgiebigen Temperatursturz wahrgenommen. Am Orte der Einwirkung aber bilden sich die unter dem Namen des „*Arthus*schen Phänomens"[1]) bekannten Gewebsschädigungen aus. Sie bestehen darin, daß ein an sich auch lokal gänzlich unschädliches Antigen nicht wie bei den Kontrollen glatt resorbiert wird, sondern zuerst zur Ödembildung, später zu dem Auftreten von Hämorrhagien führt. Die Kutis wird blaß, zunderartig morsch, verwandelt sich in den nächsten Tagen in einen braunschwarzen, derben lederartigen Schorf und stößt sich dann nach Tagen unter Entwicklung eines tiefgreifenden Geschwürs mit aufgeworfenen steilen Rändern ab. Dieses verheilt nach Wochen (vgl. dazu die beiden Abbildungen 133 u. 134).

Fig. 135.

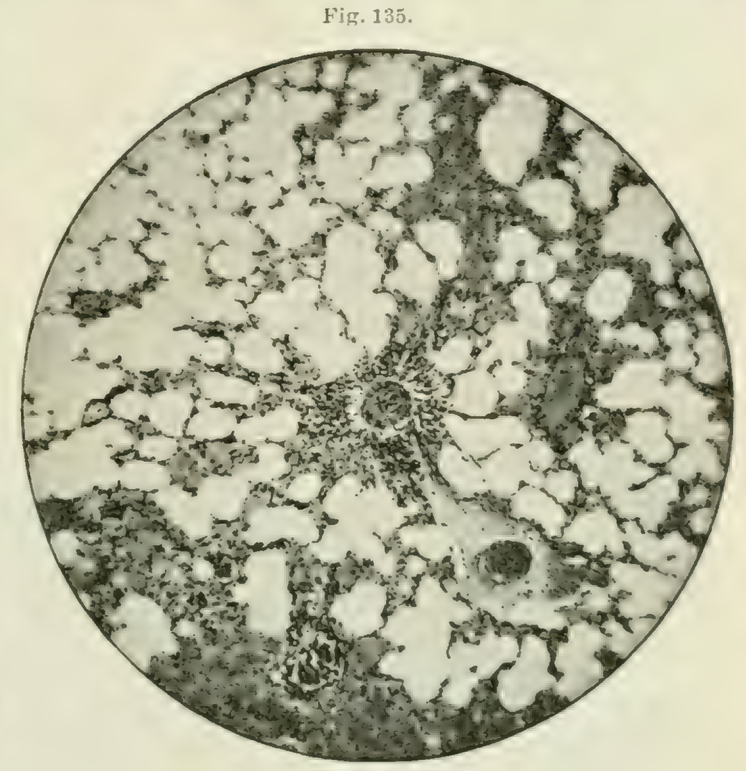
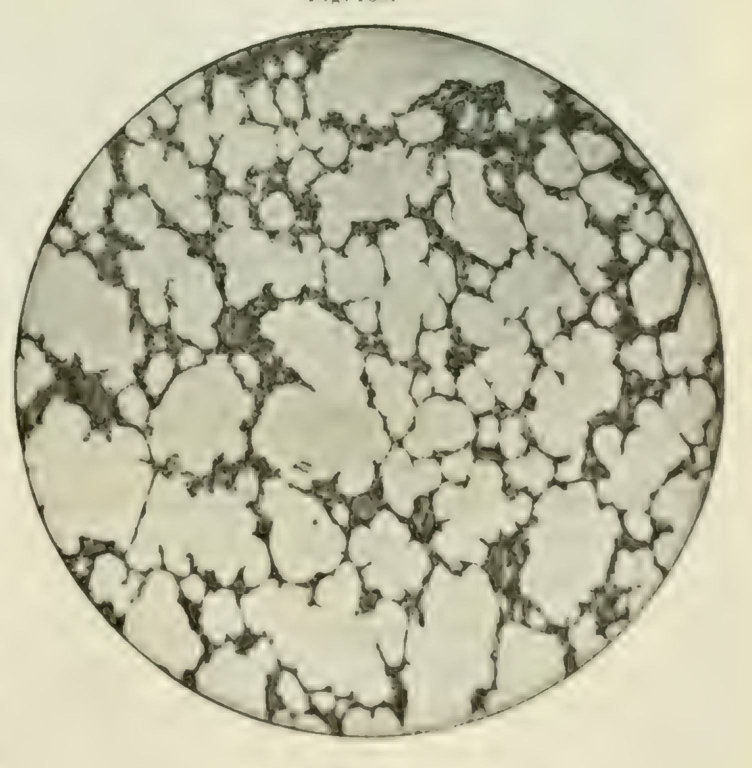


Fig. 136.



Kurz zusammengefaßt bestehen demnach die Erkrankungserscheinungen im anaphylaktischen Shock

1. bei perakutem tödlichen Verlauf in einer plötzlich peripher ausgelösten Erstickung bei nur geringgradiger Abnahme von Temperatur und Blutdruck;
2. bei schweren Fällen in

[1]) *Arthus*, Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. Compt. rend. de la société biolog. 1903. T. 55. p. 20. — Sur la séroanaphylaxie du lapin. Ebenda. 1906. T. **60**. p. 1143.

den geschilderten Allgemeinerscheinungen. Temperatursturz, Senkung des arteriellen Blutdruckes, Leukopenie und vorzugsweise Aufhebung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes mit sekundärer Fiebersteigerung und polynukleärer Leukozytose; 3. in leichtesten Fällen, ausschließlich in primärer bzw. sekundärer, einem Temperatursturz folgender Fiebersteigerung und Leukozytose; 4. bei subkutaner Applikation in dem Auftreten von Ödemen und Nekrosen.

b) Die pathologisch-anatomischen Veränderungen: Sie sind naturgemäß in perakut zum Tode führenden Fällen anders als bei langsam verlaufenden oder in Erholung ausgehenden Versuchen.

α) Bei perakut zum Tode führendem Verlauf findet man entsprechend der Tatsache, daß die Tiere an einer durch Krämpfe der Bron-



Fig. 137.



chialmuskeln verursachten Erstickung sterben, ein mehr minder hochgradig entwickeltes Lungenemphysem (*Auer-Lewis*sches Phänomen [1]). Während bei andersartig getöteten Meerschweinchen nach Öffnung des Thorax die Lungen zurücksinken und dann nur mehr das hinterste Drittel des Brustraumes einnehmen, füllen sie hier die Brusthöhlen völlig aus, indem sie in Form starrer, maximal geblähter Säcke das Herz ganz oder fast vollständig überlagern. Sie können dabei anämisch, also auffallend blaß sein, ihre Schnittflächen trocken. Doch finden sich auch häufig subpleurale oder auch tief im Gewebe sitzende ekchymotische bis flächenhafte Blutergüsse oder mehr minder aus-

[1]) l. c.

gebreitetes Lungenödem. (Vgl. dazu *Graetz* [1]), dessen vorzüglicher Arbeit ich mit seiner Zustimmung die beigegebenen Fig. 135 und 136 entnehme: Fig. 136 zeigt das alveoläre Emphysem der Lungen derartiger Tiere in vorzüglicher Weise. Fig. 135 dasselbe, daneben aber auch den Befund von Blutungen. Fig. 138 makroskopisch die Lungenblähung.) Die Bauchorgane werden im Zustande einer hochgradigen kongestiven Hyperämie angetroffen, in der Magen- und Darmschleimhaut finden sich manchmal (insbesondere bei etwas protrahierterem Verlauf) Blutungen. Die Gallenblase ist bis zum Platzen mit Galle gefüllt.

β) Bei protrahiertem tödlichen Verlauf oder subletalen Shocks. Hier fehlt das *Auer-Lewis*sche Phänomen ausnahmslos, dem prinzipiell wesensverschiedenen Todesmechanismus entsprechend. Hingegen ist die Hyperämie der Bauchorgane fast ausnahmslos anzutreffen, daneben aber (häufiger bei Kaninchen als bei Meerschweinchen) spärliche bis zahllose Ekchymosen und flächenhafte Blutungen in Magen- und Darmwand. Dafür sei die beigegebene, einer eigenen Beobachtung entnommene Fig. 137 ein Beleg.

Fig. 138.



Im Darme finden sich breiige bis flüssige Faezes neben der Erscheinung einer Gastroenteritis toxica. Als Ausdruck einer Steigerung der Gallensekretion ist auch hier die Gallenblase regelmäßig maximal durch Galle ausgedehnt. Bei längerem Krankheitsverlaufe, insbesondere aber bei subletal vergifteten und 1—2 Tage später getöteten Tieren finden wir manchmal massenhafte ekchymotische Geschwürsbildungen in Magen und Darm, daneben aber schwere bis schwerste parenchymatöse und fettige Degenerationen der Leber und insbesondere der Nieren. Für erstere gibt Fig. 137 ein Beispiel.

2. Der Nachweis einer aktiven Anaphylaxie.

a) Die Sensibilisierung. *Rosenau* und *Anderson* [2]) haben zuerst den Nachweis erbracht, daß schon ganz minimale Mengen einer artfremden Eiweiß- oder Serumart genügen, um Anaphylaxie zu erzeugen. Man muß

[1]) *F. Graetz*, Die Bedeutung der Lungenblähung als Kriterium der Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforschg. Bd. 8. H. 5 und 6. 1911. S. 740.

[2]) *Rosenau* und *Anderson*, A study of the cause of sudden death following the injection of horse serum. Hyg. Laborator Washington Bull. 29. 1906. The specific nature of Anaphylaxis. Journ. of infections diseases 1907. p. 552.

aber dabei berücksichtigen, daß, worauf insbesondere *H. Pfeiffer* und *S. Mita*[1]) hingewiesen haben, zwischen dem anaphylaktogenen Vermögen verschiedener Eiweißarten speziell dem Meerschweinchen gegenüber sehr große Unterschiede bestehen. So ist z. B. das an sich giftige Rinderserum wirksamer als schwach giftiges Pferdeserum, dieses wieder wirksamer als z. B. Hühnereiweiß und Dotter. Alle diese aber übertreffen darin artgleiche oder körpereigene und blutfremde Eiweißkörper, wie z. B. die Augenlinse, das Nieren- und Hodengewebe des Meerschweinchens für das Meerschweinchen um ein Beträchtliches. Da die letzterwähnten Sonderfälle organspezifischer Anaphylaxien der einschneidenden Differenzen in der Technik wegen für sich besprochen werden sollen, gelten die hier zunächst zu machenden Angaben nur für die Sensibilisierung mit artfremden Eiweißkörpern.

Soll mit irgend einer der Blut- oder Serumarten unserer Versuchstiere vorbehandelt werden, ohne daß dabei besondere Fragen in Betracht kommen, so hat die Materialbeschaffung und Verarbeitung meist keine Schwierigkeiten. Zu betonen ist nur für diese und alle anderen zu erwähnenden Versuche, daß man sich vor der Applikation allzu großer Dosen besonders bei Meerschweinchen hüte: 0·1—0·01 cm^3 eines artfremden Eiweiß sind hier in der Regel vollauf hinreichend und außerdem geeigneter, bei der Reinjektion gleichmäßige und intensive Ausschläge zu geben, als allzu große Dosen. Doch sind auch weitaus kleinere Mengen (bis zu 0·00001 cm^3) wirksam. Ebenso kann die Sensibilisierung in derselben Weise mit reinem Serum oder mit defibriniertem Blute erfolgen. Nur ist es dann entsprechend der sich entwickelnden oder ausbleibenden „Hämoglobinanaphylaxie" geboten, die Reinjektion mit demselben Substrat vorzunehmen, mit dem man vorbehandelte. Handelt es sich um hochtoxisches Material (Versuche *Portiers* und *Richets* am Aktinien- und Miesmuschelgift[2]), Versuche von *Doerr* und *Raubitschek*[3]) mit Aalserum), so wird eine vorherige Auswertung des Injektionsmateriales (fallende Mengen bei gleichartigen und gleich schweren Versuchstieren und gleicher Einverleibungsart) oder Entgiftung durch noch zu beschreibende Prozeduren am Platze sein, damit man nicht schon bei der ersten Einspritzung dadurch Tiere verliert.

Zur Trennung von Eiklar und Eidotter bediente sich der Verfasser mit großem Vorteile der von *P. Uhlenhuth*[4]) seinerzeit vorgeschriebenen Methode. In einem Becherglas wird Gelatine eben flüssig gemacht und der durch Hin- und Wiedergießen vom Eiklar befreite Dotter in die Gelatine

[1]) *H. Pfeiffer* und *S. Mita*, Zur Kenntnis der Eiweißanaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 1910. Bd. 6. H. 5. S. 727.

[2]) *Portier* et *Richet*, De l'action anaphylactique de certains venins. Soc. de biol. 1902. T. CLXX.

[3]) *Doerr* und *Raubitschek*, Toxin und anaphylaktisierende Substanz des Aalserums. Berliner klin. Wochenschr. 1908. Nr. 33.

[4]) *P. Uhlenhuth* und *O. Weidanz*, Ausführung der biolog. Eiweißdifferenzierungsverfahren. Bei G. Fischer, Jena 1909.

unverletzt versenkt. Durch rasches Erkalten erstarrt diese und man vermag nun mit einer Pipette Gelatineschicht und Dotter zu durchstoßen und aus dem Zentrum des letzteren den Dotter absolut rein zu gewinnen, was für das Eiklar ja ohnehin keinen Schwierigkeiten begegnet.

Um bei Versuchen mit erhitzten Eiweißlösungen zu sensibilisieren und die Koagulation zu verhüten, verdünnt man vorher nach *Besredka*[1]) die Seren auf das Drei- bis Zehnfache ihres Volumens. Sie können dann, ohne zu koagulieren, hohen Hitzegraden ausgesetzt werden.

Hat man, wie dies in der forensischen Praxis die Regel ist, mit getrockneten Eiweißkörpern zu arbeiten, so ist es notwendig, sie in der Weise mit 0·86%iger Kochsalzlösung oder mit schwacher Sodalösung zu extrahieren, daß beim Umschütteln stark schäumende, beim Blute gelbbraun gefärbte, durch die Kochprobe sich deutlich trübende Extrakte (*P. Uhlenhuth*) entstehen.

Besteht der Verdacht, daß das zur Injektion kommende Material nicht steril ist, so wird man, um Tierverluste durch Infektion zu vermeiden, gut tun, durch Berkefeldkerzen zu filtrieren.

Was die Zahl der zur Sensibilisierung notwendigen Injektionen anlangt, so genügt in der Regel eine einzige. Dann aber, wenn möglichst starke Ausschläge gewünscht, oder aber in das sensibilisierende Vermögen einer Substanz (hochgradig verändertes Material!), oder in die Empfindlichkeit einer Tierspezies Zweifel gesetzt werden (weiße Maus), kann man mehrmals mit kleinen Dosen an einigen aufeinander folgenden Tagen injizieren. Dadurch sind einheitlichere und intensivere Ausschläge bei der Reinjektion zu erzielen.

Was nun die Einbringungsart selbst betrifft, so wurden für die Vorbehandlung bisher die subkutane, die intraperitoneale, intravenöse und intrakardiale und intrazerebrale Methode gewählt. Die letztgenannte (*Besredka*) wird heute wohl kaum mehr ausgeführt, da sie keine wesentlichen Vorteile bietet.

Die beim Meerschweinchen bisher am häufigsten geübte ist die intraperitoneale Sensibilisierung, wenn auch nach einigen Autoren die intravenöse gleichmäßigere und bessere Resultate geben soll, wovon wir uns übrigens in eigenen Versuchen nicht vollauf überzeugen konnten. Hinsichtlich der Injektionstechnik sei auf die bei der Reinjektion zu machenden Angaben, besonders aber auf die ausführlichen Anleitungen in den einschlägigen Werken von *P. Th. Müller*[2]) und *U. Friedemann*[3]) verwiesen. Selbstverständlich ist es, daß die Versuchstiere bei entsprechender und hinreichender Nahrung während des präanaphylaktischen Stadiums gehalten werden müssen.

[1]) *Besredka*, De la toxicité des sérums therapeutiques et du moyen de la doser. Compt. rend. Soc. Biol. 1907. T. 62. pag. 477.

[2]) *P. Th. Müller*, Technik d. serodiagnostischen Methoden. Bei G. Fischer, Jena 1910. 3. Aufl.

[3]) *U. Friedemann*, Taschenbuch der Immunitätslehre. Bei Barth, Leipzig 1910.

Sollten Versuche über Fütterungsanaphylaxie angestellt werden, so gelingt es leicht, den Tieren reichliche Mengen des betreffenden Eiweißkörpers, an Brot oder Hafer eingetrocknet, oder aber mit der Schlundsonde einzuführen. Bei letzterer Prozedur muß man sich aber, um Fehlerquellen zu vermeiden, vor Verletzungen der Schleimhäute hüten, durch welche eventuell Antigen eindringen könnte.

Was das zu Anaphylaxieversuchen zu verwendende Versuchstier anlangt, so ist, wenn nicht spezielle Fragestellungen in Betracht kommen, wie schon aus früher Erörtertem hervorgeht, vermöge seiner hohen Empfindlichkeit das Meerschweinchen dazu am geeignetsten. Dabei muß man absolut sicher sein, nicht nur ungebrauchte Tiere in Benützung zu nehmen, sondern womöglich auch solche, welche von nicht anaphylaktischen Eltern abstammen, da bekanntlich die Überempfindlichkeit von der Mutter auf das Junge übergeht und das Fehlerquellen bedingen könnte. Die überwiegende Mehrzahl der Autoren verwendet 200—250 *g* schwere, also jugendliche Tiere, da sie im allgemeinen bei der Reinjektion als empfindlicher sich erwiesen haben, wie die ganz großen. Ohne aber die Empfindlichkeitsgrenzen hinaufzusetzen, kann man auch 350—400, selbst 450 *g* schwere Tiere verwenden, die für ein Arbeiten mit dem anaphylaktischen Temperatursturz sogar direkt gefordert werden. Die kurzhaarigen Rassen sind im allgemeinen widerstandsfähiger, aber nicht weniger empfindlich, als die sogenannte „amerikanische". Die Zahl der Versuchstiere hängt selbstredend von den Zwecken des Versuches ab, doch sollen im allgemeinen für einen einschlägigen Versuch nicht weniger als 4 Tiere verwendet werden.

Um Kaninchen sicher zu sensibilisieren, gibt *U. Friedemann* [1]) die nachfolgende Methode an: Die Tiere erhalten bei der ersten Injektion pro 1 *kg* Körpergewicht 1·0 *cm*³ Serum intravenös und bleiben dann 4 Wochen unbenützt. Nach dieser Zeit erhalten sie neuerlich dieselbe Menge in die Blutbahn. Dabei treten Krankheitserscheinungen auf, ohne aber den Tod des Tieres herbeizuführen. 8 Tage später erfolgt die Probeinjektion wieder mit derselben Menge. Ihr erliegen die Tiere fast ausnahmslos.

Ähnlich, aber noch ungünstiger sind die Verhältnisse am Hunde. Mehrfache intravenöse Injektionen werden auch hier, um sichere und gleichmäßige Resultate zu erzielen, geboten sein. Die notwendige Dosis ist, dem größeren Gewicht entsprechend und der geringeren Empfindlichkeit der Tiere Rechnung tragend, wesentlich größer. *Biedl* und *Kraus* [2]), die diesbezüglich wohl über die reichsten Erfahrungen verfügen, sensibilisierten mit je 3—5 *cm*³.

b) Die Reinjektion. Um die einer Probeinjektion folgenden Krankheitserscheinungen mit Sicherheit als anaphylaktische bezeichnen zu dürfen,

[1]) *U. Friedemann*, Über die Kriterien des anaphylaktischen Zustandes. Zeitschr. f. Immunitätsforschg. 1909. Bd. 3. H. 7. pag. 726.

[2]) l. c.

ist es notwendig, hinsichtlich des zu verwendenden Materials und seiner Dosierung sowie der Technik gewisse Kautelen einzuhalten, will man sich nicht groben Irrtümern aussetzen. Da eine ganze Reihe artfremder Seren und Eiweißkörper auch auf unvorbehandelte Tiere an sich teils eine geringe, teils eine recht beträchtliche Giftwirkung äußern, die sich in ihrer Symptomatologie nicht von den Erscheinungen des anaphylaktischen Shocks trennen läßt, teilweise durch die Wirkung von im Substrate enthaltenen hämolytischen Normalambozeptoren und Komplementen bedingt ist, so muß in jeder Versuchsreihe die Wirkung des Injektionsmaterials mindestens an zwei gleich schweren und gleich großen, sicher unvorbehandelten Kontrolltieren ausgeprobt, ihre Wirkungslosigkeit festgestellt oder aber bei vorhandener toxischer Wirkung — die Temperaturreaktion ausgenommen — mit Injektionsmengen gearbeitet werden, die unter der am Kontrolltier ermittelten Dosis toxica bzw. letalis liegen.

Um von vornherein solchen Fehlerquellen auszuweichen, haben zuerst *Doerr* und *Raubitschek* [1]) bei ihren Studien am Aalserum die toxische Komponente für die Probeinjektion teils durch zweistündiges Erhitzen auf 60°, teils durch Zusatz von 0·4—1⁰/₀iger konzentrierter Salzsäure und nachträgliches Neutralisieren mit Sodalösung zerstört und nun mit diesem an sich für das unvorbehandelte Tier atoxischen, in vorzüglicher Weise aber noch die anaphylaktischen Krankheitserscheinungen auslösenden Material gearbeitet. In ähnlicher Weise kann man auch, wie eigene Erfahrungen lehrten [2]), die Seren der gewöhnlichen Schlachttiere vor der Probeinjektion inaktivieren und sie so ihres giftigen Eigenvermögens berauben. Von Körperzellen stammende Eiweißkörper, z. B. das Eiweiß der Augenlinse, kann man übrigens auch durch Trocknen über Schwefelsäure im Vakuum und länger dauerndes Aufbewahren im trockenen Zustande, ohne ihre shockauslösenden Eigenschaften zu alterieren, für unvorbehandelte Tiere oder andersartig präparierte Kontrollen entgiften. [3]) Nur bei ganz indifferenten Flüssigkeiten, wie bei Hühnereiklar, Hämoglobin, kann man diese Präparierung entbehren. Die Emulsionen mancher, auch artgleicher Organe (so insbesondere der Niere) haben an sich eine äußerst intensive, dabei aber thermostabile Giftwirkung, die nicht an dem Zelleneiweiß selbst haftet. Durch wiederholtes Waschen der Emulsion mit erneuten Mengen von Kochsalzlösung kann man hier zu einem Ziele kommen. [4])

Will man mit der Auslösung des anaphylaktischen Shocks auch noch die Diagnose der Artzugehörigkeit des Antigens der Vorbehandlung verbinden, so genügt die Entgiftung des Materials und seine Kontrollierung

[1]) l. c.

[2]) *H. Pfeiffer*, Versuchstechnische Bemerkungen zum Nachweis des anaphylaktischen Temperatursturzes. Wiener klin. Wochenschr. 1909. Nr. 36. pag. 1227.

[3]) *S. Mita*, Über die Verwertbarkeit des anaphylaktischen Temperatursturzes. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 1910. Bd. 5. T. 2 u. 3. pag. 297.

[4]) *H. Pfeiffer*, Zur Organspezifität der Überempfindlichkeit. Ebenda. 1910. T. 3. pag. 358.

am nicht präparierten Tiere keineswegs. Es ist vielmehr notwendig, hier, um vor Täuschungen sicher zu sein, auch mit andersartigem Antigen vorbehandelte Meerschweinchen in derselben Weise und mit demselben Material zu behandeln. Das Ausbleiben des anaphylaktischen Shocks bei dem einen, sein Auftreten bei den anderen sichert allein in zuverlässiger Weise die gewonnenen Resultate des Versuches.

Was die Vorbereitung des Materials anlangt, so muß es selbstverständlich auf Körpertemperatur erwärmt werden und — wenn man eine größere Reihe von Tieren zu injizieren hat — auch im Wasserbade auf Körpertemperatur erhalten werden. Während die Beimengung größerer korpuskulärer Elemente die Ergebnisse bei der subkutanen und intraperitonealen Reinjektion nicht stören, sind solche bei direkter Applikation in die Blutbahn strenge zu vermeiden.

Die Menge des Injektionsmaterials variiert selbstverständlich nach der Art ihrer Einführung in den Tierorganismus. Es sei hier nur die für das klassische Versuchstier, für das Meerschweinchen, übliche Menge angegeben. Die subkutane Reinjektion, wie sie *Arthus*, *Smith* und auch *Otto*[1]) anwendeten, ist heute der geringen Allgemeinreaktion wegen wohl ganz verlassen, wenn nicht speziell die lokalen Veränderungen beobachtet werden sollen. Selbst bei der Anwendung großer Serummengen (5—10 cm^3) wird man, ohne Beobachtung der Temperaturverhältnisse, aus der Schwere der allgemeinen Symptome nicht immer zu einwandfreien Resultaten kommen, Tod im anaphylaktischen Shock nur in einem recht geringen Prozentsatze der Fälle eintreten sehen.

Die intraperitoneale Injektion erfordert bei gut entwickelter Überempfindlichkeit Antigenmengen von 1—2—5 cm^3. Damit kann man regelmäßig deutliche Krankheitserscheinungen, manchmal den Tod der Tiere in 2—4 Stunden, fast ausnahmslos aber schwere anaphylaktische Störungen der Temperatur herbeiführen.

Am meisten eingebürgert hat sich heute die intravenöse Reinjektion, und zwar ihrer hohen Wirksamkeit wegen, die sich in dem Eintreten des akuten Todes der Tiere äußert. Hier liegt die Injektionsdosis niedriger, sie beträgt im Mittel 0·1—0·01 cm^3. Manche Autoren, so *E. Friedberger* und *Burkhardt*[2]) (in ihren Studien über die Inkubationszeit) verwenden aber auch insbesondere dann weitaus größere Mengen (bis zu 1·0 und 2·0 cm^3), wenn zu erwarten steht, daß die Überempfindlichkeit nur in geringem Maße ausgebildet ist. Doch soll hier nachdrücklich von einer kritiklosen Anwendung dieser Methode gewarnt werden, die bei dem raschen, tödlichen Verlauf eingehende Beobachtungen am lebenden Tier schwierig gestaltet, außerdem die Überprüfung des Resultates durch Feststellung

[1]) *Otto*, Das *Theobald Smith*sche Phänomen der Serumüberempfindlichkeit. *v. Leuthold* Gedenkschrift. 1905. Vol. 1.

[2]) *E. Friedberger* und *Burkhardt*, Weitere Untersuchungen über Eiweißanaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 4. H. 5. pag. 690.

einer Antianaphylaxie dadurch unmöglich macht, daß häufig alle Versuchstiere im Shock bleiben.

Dieselben Mengenverhältnisse gelten im allgemeinen für die intrakardiale, von *P. Uhlenhuth*[1]) bevorzugte Einspritzung. Er verwendet 0·25 bis 1·0 *cm*³ reinen inaktiven Serums oder von Pflanzeneiweißlösungen 1 *cm*³ der 10—25⁰/₀igen Extrakte. Doch sei, insbesondere bei fehlender Übung, vor dieser Technik ausdrücklich gewarnt, da sie an sich einen nicht unwesentlichen Eingriff darstellt.

Auch die von *Besredka*[2]) infolge einer bestimmten Fragestellung früher viel geübte intrazerebrale Methode wird in neuerer Zeit wenig verwendet. Auch hier schwankt die injizierte Serummenge zwischen 0·25 und 0·01 *cm*³.

Was die Injektionstechnik anlangt, so ist ein aseptisches Arbeiten für sämtliche Methoden ein hier nicht näher zu begründendes Postulat. Da die subkutane und intraperitoneale Methode wohl keine Schwierigkeiten mit sich bringt, so genügt der Hinweis, daß man zweckdienlich ein Rückfließen des Materials und die damit zusammenhängende Ungenauigkeit durch Verschluß der Injektionsöffnung (Fassen der Haut mit Péan, Ligatur!) verhindert.

Die intravenöse Injektion geschieht beim Meerschweinchen in die Jugularis des gefesselten Tieres. Das Gefäß wird durch einen von innen unten nach oben zu aufsteigenden Hautschnitt sichtbar gemacht, rasch freipräpariert und durch zwei Sperrpinzetten abgeklemmt. Dann wird die Spritze zwischen ihnen in die Jugularis eingestoßen, nachdem man sich vorher vergewissert, daß weder in der Spritze noch in der Kanüle Luftblasen vorhanden sind, und injiziert unter Lüftung der zentralen Pinzette langsam und stetig die Flüssigkeit. Der Gehilfe faßt im Momente des Zurückziehens der Kanüle die Einstichöffnung und ligiert sie. Naht mittelst Michelklammern.

Die stets zu entbehrende und nicht empfehlenswerte intrazerebrale Injektion wird nach vorheriger Trepanation des Tieres vorgenommen.

Hinsichtlich des **günstigsten Zeitpunktes** für die **Probeinjektion** wird heute allgemein der 10.—21. Tag nach einer Sensibilisierung mit mittleren Dosen angegeben. Nach den ausgedehnten Erfahrungen von *Doerr* und *Ruß* wird man aber dann, wenn nur mit minimalen Dosen oder aber mit einem weitgehend veränderten Antigen vorbehandelt wurde, noch länger warten. Vor dem 25. Tage ist ein positives Ergebnis hier nicht zu erwarten.

Hat man somit die Reinjektion der auf Anaphylaxie zu prüfenden Meerschweinchen und der Kontrollen vorgenommen, so ist nach den im ersten Abschnitt wiedergegebenen Kriterien die Deutung der Versuchs-

[1]) *P. Uhlenhuth* und *Haendel*, Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 4. H. 6. pag. 761

[2]) l. c.

resultate dann eine leichte, wenn schwere Krankheitserscheinungen oder gar der Tod der sensibilisierten Tiere eintritt, die Kontrollen aber gesund bleiben. Bei der Protokollierung der Ergebnisse verfährt man zweckmäßig in der aus der beigegebenen Tabelle 1 ersichtlichen Weise:

Tabelle 1.

5 Meerschweinchen, am 1. Februar 1911 intraperitoneal sensibilisiert mit je 0·01 inaktivem Rinderserum, 1—3, 6, 7 intravenös reinjiziert mit 0·5—0·1 inaktivem Rinderserum (RSe), 4, 5, 8 und 9 reinjiziert mit 0·5 inaktivem Pferdeserum (PfSe). Tier 6—9 normale Kontrollen. Reinjektion am 15. Februar 1911.

Nr.	Sensibilisierung	Intervall	Reinjektion	Resultat
1	0·01 RSe	14. Tag	0·5 RSe	† 10 Minuten unter Krämpfen
2	„	„	0·25 „	† 20′ unter schwersten Erscheinungen
3	„	„	0·1 „	Schwerste Erscheinungen, erholt sich
4	„	„	0·5 PfSe	Keine Erscheinungen
5	„	„	0·25 „	„ „
6	—	—	0·5 RSe	„ „
7	—	—	0·5 „	„ „
8	—	—	0·5 PfSe	„ „
9	—	—	0·5 „	„ „

Dazu ist zu bemerken, daß bei dieser allgemeinen klinischen Beurteilung der Resultate in „schwerste, schwere und leichte Erscheinungen" bzw. „keine Erscheinungen" dem Belieben und der Erfahrung des einzelnen Beobachters der weiteste Spielraum gelassen ist und ferner, daß so die leichteren Formen anaphylaktischer Erkrankungen der Beobachtung völlig entgehen. Es war daher dringend geboten, insbesondere für die feineren Untersuchungen über Blutverwandtschaft, über die Möglichkeit, verschiedene von einer Spezies stammende Eiweißkörper zu trennen, in Fällen nur unausgesprochener Überempfindlichkeit exaktere, vor allem objektiv feststellbare und feinere Kriterien zu verwenden. Sie sollen unter einem mit der Maßmethode des anaphylaktischen Shocks hier kurz besprochen werden.

c) Die Maßmethoden des anaphylaktischen Shocks (H. Pfeiffer [1]). Ihr Prinzip beruht auf dem Nachweis einer Überempfindlichkeit vermittelst des anaphylaktischen Temperatursturzes. Da das Phänomen einer Temperaturerniedrigung an sich nichts Charakteristisches darstellt und auf die Einwirkung der verschiedenartigsten Agenzien hin zustande kommt, bedarf es hier einer bestimmten Versuchstechnik, welche es ermöglicht, die Erscheinung als anaphylaktische sicherzustellen.

[1]) *H. Pfeiffer,* Versammlung der Naturforscher und Ärzte in Salzburg 1909. Abgedruckt Vierteljahrschr. f. gerichtl. Medizin, 3. Folge. Bd. **39**. Suppl.-Heft. pag. 115. Vgl. dazu auch *S. Mita,* Über die Verwertbarkeit des anaphylaktischen Temperatursturzes. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. 1910. Bd. 5. H. 2/3. pag. 297.

Hinsichtlich der Auswahl der Versuchstiere — Meerschweinchen — gilt dasselbe, was bei der Sensibilisierung und Reinjektion im allgemeinen gesagt wurde, nur sind hier etwas ältere Tiere im Anfangsgewicht von 300—350 *g* vorzuziehen, welche zur Zeit des Versuches dann ein Gewicht von 350—400 *g* erreicht haben. Sensibilisierung und Reinjektion werden, wenn die Versuchsbedingungen nicht allzu ungünstig liegen, intraperitoneal ausgeführt.

Das zur Reinjektion zu verwendende Antigen muß vor der Probeinjektion — was übrigens für alle anaphylaktischen Untersuchungen, nach welcher Methode sie auch immer vorgenommen werden mögen, gefordert werden muß — in jenen Mengen und darüber hinaus an sicher unvorbehandelten normalen und gleich schweren Versuchstieren ausgewertet werden. Diese Titrierung hat bei intraperitonealer Reinjektion auf intraperitonealem, bei intravenöser auf intravenösem Wege zu erfolgen. Ergibt es sich dabei, daß dem betreffenden genuinen Serum in den zum Versuche nötigen Mengen an sich beträchtliche giftige und temperaturherabsetzende Wirkungen zukommen, so muß es bei 57° C ein- oder mehrmals durch je eine Stunde inaktiviert werden. Auf diese Weise erreicht man es leicht, das toxische Eigenvermögen der Tierseren so weit zu zerstören, daß es als Fehlerquelle nicht mehr in Betracht kommt. Sollte bei nichtgenügender Inaktivierung an den Kontrollen eine temperaturherabsetzende Wirkung beobachtet worden sein, so ist dies nach den gleich zu besprechenden Grundsätzen genau zu registrieren.

Es hat die Reinjektion frühestens 14, besser noch 21 Tage nach der Vorbehandlung mit jener inaktivierten Serum- oder Eiweißmenge zu erfolgen, die im Vorversuche sich als unwirksam erwies, bzw. die Temperatur der unvorbehandelten Kontrolltiere nur in geringerem Ausmaße als 1° C zu alterieren vermochte.

Da auch durch zu ausgiebiges Rasieren und Waschen namentlich bei jungen Tieren und in der kalten Jahreszeit gleichfalls nicht auf den anaphylaktischen Shock zurückzuführende, also unspezifische, wenn auch nur ganz geringfügige Temperaturabnahmen herbeigeführt werden können, so müssen die nur an einer eben genügend großen Stelle der Bauchhaut rasierten und desinfizierten Tiere möglichst schonend und rasch injiziert und weiterhin in einem wohltemperierten Raume verwahrt werden, in welchen sie schon 12 Stunden vor Anstellung des Versuches gebracht wurden. Die Injektion darf selbstverständlich nur mit Materialien vorgenommen werden, welche auf Körpertemperatur vorgewärmt wurden.

Weiterhin ist die rektal zu messende Normaltemperatur der Meerschweinchen von Tier zu Tier großen Schwankungen unterworfen, so konstant sie auch bei entsprechender Pflege für ein und dasselbe Tier ist. Bei ganz großen Tieren liegt sie im allgemeinen niedriger (38·8) als bei mittelgroßen (39·0) oder bei jungen Tieren (39·3). Es ist daher bei der Prüfung auf das Vorhandensein des anaphylaktischen Temperatursturzes immer kurz vor der Einverleibung, jedoch nach der Desinfektion der

Injektionsstelle die Temperatur genau rektal zu messen und nun von 15 zu 15 Minuten ihr weiteres Verhalten zu verfolgen, bis sie, bei einem positiven Ergebnis, wieder zur Norm zurückgekehrt ist.

Verwendet man zur Reinjektion die Einverleibung in die Blutbahn, so ist zu beachten, daß schon durch die dabei nötige Fesselung der Tiere ihre Körpertemperatur um ein Geringes absinkt, nach der Befreiung der Tiere aber sofort wieder ansteigt und bald die Norm wieder erreicht hat. Es ist deshalb notwendig, hier als Ausgangspunkt der Messung jene Temperatur zu nehmen, welche unmittelbar nach der Befreiung des Tieres festgestellt wurde.

Zur Temperaturbestimmung bedient man sich zweckmäßig eines nach den Angaben *W. Weichardts* konstruierten kleinen, rasch und exakt messenden Thermometers, welches man tief in den Enddarm einführen kann. Es ist von *Gustav Eger*, Graz, Halbärthgasse, zu beziehen. Die Temperaturmessung hat während des Abfalles alle Viertelstunden, während des Ansteigens alle halben Stunden so lange zu erfolgen, bis die Normaltemperatur wieder erreicht ist.

Haben die Kontrollen auf die Injektion gar nicht reagiert, so kann ein Temperaturabfall von mehr als 1·5° C unter die Ausgangstemperatur als in positivem Sinne entscheidend angenommen werden, d. h. er beweist, daß zur Reinjektion das bei der Vorbehandlung verwendete Antigen eingespritzt wurde, und gestattet noch unter Voraussetzungen die sichere Diagnose „anaphylaktischer Shock", wo alle anderen bisher bekannt gewordenen Symptome — mit Ausnahme von *E. Friedbergers* Fieberreaktion [1]) — im Stiche lassen.

Um den Verlauf eines derartigen Versuches anschaulich zu machen, empfiehlt es sich, das Resultat in Form einer Kurve in der Weise auf einem Millimeterpapier einzuzeichnen, daß man auf der Ordinate für je 10 *mm* 1° C, auf der Abszisse die seit der Injektion verflossene Zeit so markiert, daß 12 *mm* = 60 Minuten entsprechen.

Selbstverständlich ist aber, daß dort, wo andere Symptome, wie allgemeine Depression, Krampfzustände, Dyspnoe usw., sich vorfinden, auch sie zur Diagnose mit herangezogen werden müssen. Bei leichteren Erkrankungsformen aber wird man auf die Temperaturreaktion allein allerdings angewiesen sein.

Die beiden hier abgebildeten, einer Arbeit von *H. Pfeiffer* und *S. Mita* [2]) entnommenen Kurven werden den Verlauf solcher Versuche begreiflich machen.

In Fig. 139*a* wurden zwei Meerschweinchen mit geringen Mengen von Katzenblut intraperitoneal vorbehandelt. Das anaphylaktisch erkrankte Tier erhielt 0·5 Katzenblut (Ktzbl.), das andere, welches gesund bleibt, 1·5 Hundeblut (Hdblt.) intraperitoneal.

[1]) l. c. Nr. 8.

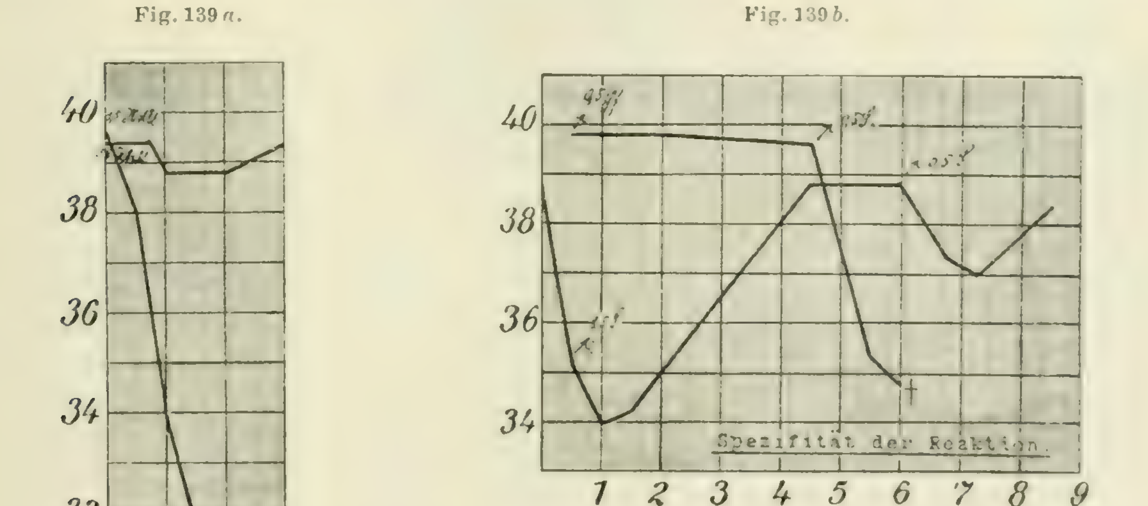
[2]) *H. Pfeiffer* und *S. Mita*, Studie über Eiweißanaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 4. H. 4. pag. 410.

Fig. 139 *b* zeigt die Temperaturverhältnisse von zwei Meerschweinchen, welche mit Schweineserum sensibilisiert wurden. Das erste Tier erhält 0·5 *cm*³ inaktiven Schweineserums (S.), Tier 2 dieselbe Menge inaktiven Pferdeserums (Pf.) intraperitoneal, Mengen, die sich an unvorbehandelten Kontrollen als völlig wirkungslos erwiesen hatten. Das erste Tier zeigte einen Temperatursturz bis 34·5° C, das zweite behält seine Normaltemperatur zunächst bei, erkrankt aber, als ihm einige Stunden später gleichfalls Schweineserum injiziert wird, tödlich unter einem schweren Temperaturabfall.

Auf dem Wege der Temperaturmessung gelingt es nun auch, zu einem ziffernmäßigen Ausdruck für die beobachteten Shockgrößen zu gelangen und das, wie *H. Pfeiffer* angegeben, *S. Mita*[1]) des Näheren ausgeführt hat, in der folgenden Weise:

In Erkrankungsfällen, die in Erholung ausgehen, besteht regelmäßig ein absoluter Parallelismus zwischen der Schwere der bei einfacher Beob-

Fig. 139 *a*. Fig. 139 *b*.



achtung erkennbaren Erkrankungssymptome und zwischen der Größe der Temperaturabnahme und der Zeit, die verstreicht, bis das Tier seine Normaltemperatur wieder erreicht. Beide der Größe des Shocks direkt proportionale Faktoren können demnach als Maß für den anaphylaktischen Shock verwendet werden. Berücksichtigt man die Form der durch fortgesetzte genaue Messung erhaltenen Temperaturkurven, so zeigt es sich, daß sie im allgemeinen Dreiecksform besitzen. Gleich schwere Versuchstiere vorausgesetzt, kann demnach die Größe des anaphylaktischen Shocks ausgedrückt werden durch den Flächeninhalt jenes Dreiecks, welches die Temperaturabnahme zur Höhe, die Zeitdauer bis zur Erreichung der Ausgangstemperatur als Basis hat. Es ist demnach die Shockgröße (Sg) gleich dem halben

[1]) l. c.

Produkt aus der Größe der Temperaturabnahme (ta) und der Zeitdauer der anaphylaktischen Erkrankung (Z). $Se = \frac{ta \cdot Z}{2}$, wobei als Einheit für ta = 0·1° C. für Z = 1 Minute zu wählen ist.

Andere Verhältnisse, die hier des Näheren nicht erörtert werden können, liegen bei einem tödlichen Verlauf der Erkrankung vor. Als praktisch brauchbar hat sich zur ziffernmäßigen Einschätzung dieser Ergebnisse die empirisch gefundene Formel $S\dagger = 30.000 + 20.000 - \frac{ta\dagger Z\dagger}{2}$ bewährt, wobei unter ta † die bis zum Tode eingetretene Temperaturabnahme in Zehntelgraden Celsius, unter Z † die bis zum Tode verflossene Zeit in Minuten zu verstehen ist.

Einige praktische Ergebnisse werden die Protokollierung und Berechnung ohne weiteres klar machen.

Tabelle 2.
Entwicklung der Anaphylaxie.
(5.—40. Tag.) Rinderserum.

Vorbehandlung. Rinderserum	Intervall. Tage	Reinjektion. Rinderserum	Temperaturabnahme	Zeit	Shock	Mittel
0·01	5	2 *cm*³	0	0	0	0
0·01	10	2 „	31	530	5.115	2.564
0·01	10	2 „	27	530	4.450	
0·01	10	2 „	0	0	0	
0·01	10	2 „	13	105	683	
0·01	15	2 „	50	60 †	† 48.500	37.425
0·01	15	2 „	52	45 †	† 48.830	
0·01	15	2 „	47	60 †	† 48.590	
0·01	15	2 „	36	210	3.780	
0·01	20	2 „	17	150	1.275	26.234
0·01	20	2 „	50	90 †	† 47.750	
0·01	20	2 „	63	90 †	† 47.165	
0·01	20	2 „	53	330	8.745	
0·01	40	2 „	5	90	225	24.131
0·01	40	2 „	10	75	375	
0·01	40	2 „	61	75 †	† 47.213	
0·01	40	2 „	6	75	450	

Tabelle 2 (abgedruckt aus *S. Mita,* l. c.): Sie gibt die Entwicklung einer gegen Rinderserum gerichteten Anaphylaxie. Besondere Kontrollen waren hier nicht nötig, da schon frühere Versuche die völlige Ungiftigkeit des verwendeten Serums in den angeführten Mengen ergeben hatten. Die tödlichen, nach der S †-Formel berechneten Fälle sind mit dem Kreuzeszeichen kenntlich gemacht, die Mittelwerte sind aus den einzelnen Versuchsgruppen berechnet.

Diese Maßmethode ermöglicht es auch, mit an sich den Kontrollen gegenüber nicht ganz ungiftigem Material ohne weiteres zu arbeiten und

jene Reaktionsgrößen zu bestimmen, die auf Rechnung des anaphylaktischen Shocks, nicht aber auf das toxische Eigenvermögen zu beziehen sind.

Zu dem Zwecke ist es in solchen Fällen nur notwendig, die Reaktionsgrößen der Kontrollen von jenen der sensiblen Tiere abzuziehen, so daß man den „reduzierten Shock“ als rein anaphylaktischen berechnen kann.

Tabelle 3, derselben Arbeit *S. Mitas* entnommen, wird das ohne weiteres verständlich machen. Die Angaben beziehen sich auf Versuche über Anaphylaxie gegen Rinderlinse.

Tabelle 3.

Rinderlinsenanaphylaxie.

Vorbehandlung	Intervall	Reinjektion	Temperaturabnahme	Zeit	Shock absolut	Shock reduziert
0	—	0·08 Rinderlinse, getrocknet .	8	120	480	—
0	—	0·06 Meerschweinchenlinse, getrocknet	0	0	0	—
0	—	2·0 Rinderserum, inaktiv . .	6	60	180	—
1/2 Rinderlinse	21	0·06 Meerschweinchenlinse .	32	180	2.880	2.880
1/2 „	21	0·08 Rinderlinse	81	420	17.010	16.530
1/2 „	21	2·0 Rinderserum, inaktiv . .	14	105	735	555

Vgl. dazu übrigens die gleichsinnigen Resultate von *F. Krusius*[1]), die gleichfalls mit Hilfe des anaphylaktischen Temperatursturzes gewonnen, die Feinheit und Exaktheit der Methodik widerspiegeln. Über die Größenbestimmung einer im Einzelfalle gegebenen Anaphylaxie aus den beim anaphylaktischen Shock gefundenen Werten vgl. *H. Pfeiffers* Monographie: Das Problem der Eiweißanaphylaxie, Fischer, Jena 1910, S. 110ff.

d) Die Differentialdiagnose des anaphylaktischen Shocks gegenüber verwandten oder wesensgleichen, aber nicht anaphylaktischen Vergiftungsbildern. Es wurde schon früher kurz erwähnt, daß manche normale Tierseren toxisch auf das Meerschweinchen zu wirken vermögen. Untersuchungen von *P. Uhlenhuth*[2]) und später eigene[3]) sowie solche von *Doerr* und *Moldovan*[4]) und *E. Friedberger*[5]) haben ergeben, daß das dabei in Erscheinung tretende Vergiftungsbild die größte Ähnlichkeit mit dem des anaphylaktischen Shocks aufweist. Hier wie dort gehen die Tiere bei großen Dosen und intravenöser Injektion akut unter den Erscheinungen einer Lungen-

[1]) *F. Krusius*, Überempfindlichkeitsversuche vom Auge aus. Archiv f. Augenheilk. 1910. Bd. 67. H. 1. pag. 6. Erg.-Heft pag. 49.

[2]) *P. Uhlenhuth*, Zur Kenntnis der giftigen Eigenschaften des Blutserums. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. 26. S. 384.

[3]) *H. Pfeiffer*, Über die nekrotisierende Wirkung normaler Seren. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. 51. pag. 183 und Experimentelle Studien zur Lehre von den Autointoxikationen. Bd. 56. pag. 419.

[4]) *Doerr* und *Moldovan*, Analyse des Präzipitationsphänomens etc. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1910. Bd. 5. H. 2/3. pag. 125.

[5]) *Friedberger*, l. c.

blähung zugrunde, bei protrahierterem Verlauf beobachtet man Temperaturabfall, Somnolenz, Singultus, Paresen der Hinterbeine, Diarrhöen, Harnabgang, bei subkutaner Applikation schwere Nekrosenbildung. Die pathologisch-anatomischen Erscheinungen decken sich gleichfalls völlig mit jenen der Anaphylaxie. Ja Ergebnisse von *Doerr* und *Moldovan* (l. c.), *Graetz*[1]), *E. Friedberger*[2]) und *H. Pfeiffer*[3]) haben es trotz der Einwendungen von *R. Kraus*[4]) und seiner Mitarbeiter sichergestellt, daß nicht nur eine Ähnlichkeit, sondern eine Identität der Erscheinungen vorliegt und daß bei solchen „Hämolysinvergiftungen" sich tatsächlich ein dem Anaphylaxiegift wesensgleiches Produkt bildet. Während aber dort die Giftbildung erfolgt durch den Zusammentritt des im Tier immunisatorisch präformierten Antieiweiß und dem ihm normalerweise eignenden Komplement mit dem atoxischen Antigen der Reinjektion, tritt hier der hämolytische Normalambozeptor des artfremden Serums und des Komplements in Verbindung mit dem lebenden Eiweiß des Versuchstieres und gibt auf diese Weise Anlaß zur Giftentstehung. Diese ist also prinzipiell verschieden, die dabei entstehenden Produkte sind aber, wenigstens ihrer Wirkung nach zu urteilen, wesensgleich.

Da wir nun bei der Prüfung auf aktive Anaphylaxie häufig gezwungen sind, mit heterologen Normalseren zu arbeiten, so ist bei jedem Versuche unbedingt zu fordern, daß wir die Eigentoxizität des Materiales kennen und ihr entweder dadurch, daß wir sie zerstören, oder wenigstens dadurch, daß wir sie genau in Betracht ziehen, als Fehlerquelle ausweichen.

Es ist also, toxisches Material vorausgesetzt, nur aus den quantitativen Ergebnissen ein sicherer Schluß auf das Vorliegen einer Anaphylaxie zulässig bzw. unter gewissen Kautelen auch aus der Prüfung auf Antianaphylaxie: Daß dabei wieder der mit ziffernmäßigen Ergebnissen arbeitende anaphylaktische Temperatursturz die verläßlichsten Ergebnisse liefert, ergibt sich nach dem Vorgesagten von selbst und er hat sich uns selbst, wie auch insbesondere *Krusius* (l. c.) bei der Differenzierung nahe verwandter Blutarten oder an sich toxisch wirkender Organeiweiße (Preßsaft von Nieren, Spermatozoenemulsionen usf.) besser bewährt als alle anderen Methoden.

Soll eine Untersuchung über Anaphylaxie gegen Toxalbumine vorgenommen werden, wie dies z. B. von *Richet*[5]) für das Aktinien- und Miesmuschelgift durchgeführt wurde, so ist es selbstverständlich, daß dem Anaphylaxieversuch eine genaue qualitative und quantitative Analyse der giftigen Agenzien am unvorbehandelten Tier vorauszugehen hat. Speziell für *Richets* eben erwähnte Versuche ergab es sich, daß die hohe Giftwirkung

[1]) l. c.

[2]) *E. Friedberger* und seine Mitarbeiter, Über Anaphylaxie. XII—XV. Mitteilung. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 9. Nr. 3. pag. 369.

[3]) *H. Pfeiffer*, Experimentelle Beiträge zu Kenntnis der Anaphylaxie etc. Zeitschrift f. Immunitätsforsch. 1911. Im Druck.

[4]) *Biedl* und *Kraus*, Über die Giftigkeit heterologer Sera und Kriterien der Anaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1910. Bd. 7. H. 4. pag. 408.

[5]) l. c.

seiner Präparate sowohl in ihrem zeitlichen Auftreten als auch in ihrer Wesenheit streng unterschieden werden konnte von den Krankheitserscheinungen des anaphylaktischen Shocks.

e) **Die Prüfung der Harntoxizität anaphylaktischer Tiere.** Verfasser[1]) hat kürzlich darauf aufmerksam gemacht, wie der Harn anaphylaktisch erkrankter Tiere ein enormes Ansteigen seiner geringen physiologischen Toxizität erkennen läßt und hat gezeigt, daß die damit im Meerschweinchenversuch erzielbaren Vergiftungsbilder identisch sind mit jenen des anaphylaktischen Shocks, so daß aus dem genannten Grunde, aber auch aus vielfachen anderen Ergebnissen heraus es wahrscheinlich geworden ist, daß das Anaphylaxiegift durch den Harn der Tiere ausgeschieden werde. Es hat sich weiterhin ergeben, daß die Harntoxizität ein sehr empfindliches Kriterium für einen parenteralen Eiweißzerfall nicht nur im anaphylaktischen Shock, sondern auch unter anderen dazu führenden Versuchsbedingungen ist. Es seien daher kurz über die Methodik solcher biologischer Harnanalysen einige Angaben gemacht.

Dem Harnspender, im gegebenen Falle dem anaphylaktisch erkrankten Meerschweinchen, wird sofort nach der Injektion etwa in seiner Blase vorhandener Harn durch sanftes, allmählich an Intensität zunehmendes Pressen entleert und dann bei Männchen der Penis, bei Weibchen die Urethralöffnung fest ligiert. Zu der Zeit, wo eine Harnfraktion untersucht werden soll, wird sie auf gleiche Weise entleert und neuerdings ligiert, oder aber das Tier getötet, die Blase steril entnommen und der Harn in einer Eprouvette aufgefangen. Nach fünfstündiger Versuchsdauer sind meist 4—6 cm^3 Harn vorhanden, Mengen, die zur Untersuchung reichlich genügen.

Der Harn wird nun mit 1—2 Tropfen Chloroform versetzt, gut durchgeschüttelt und klar zentrifugiert. Da seine alkalische Reaktion[2]) nicht oder fast nicht das Versuchsresultat stört, kann man den durch Zentrifugieren geklärten Harn mit einer Kapillarpipette entnehmen und nun in der Menge von je 2 cm^3 zwei Meerschweinchen im Gewichte von 300—350 *g* injizieren, dem ersten Tiere intraperitoneal, dem zweiten subkutan. Man beobachtet nun, insbesondere beim ersten, ob allgemeine Krankheitserscheinungen auftreten, die sich mit jenen des anaphylaktischen Shocks decken und ob sie stark, schwach oder gar nicht ausgeprägt sind, und stellt durch fortlaufende Temperaturmessungen die Temperaturkurve der Tiere bis zum Wiedereintritt zur Norm fest. Da auch hier die Stärke des Temperaturabfalles der Stärke der allgemein toxischen Wirkung absolut parallel geht, ist es durchaus zulassig, wie beim anaphylaktischen Shock und unter Benutzung der früher dafür erörterten Formeln die Giftigkeit der Harne auszuwerten.

[1]) *H. Pfeiffer*, Zur Kenntnis der Anaphylaxie und Hämolysinvergiftung. Wiener klin. Wochenschr. 1910. Nr. 42. pag. 1484. Ebenda: Zur Kenntnis der photodynamischen Wirkungen fluoreszierender Stoffe. 1911. Nr. 1. pag. 1.

[2]) Sauere Harne sind vor der Auswertung mit Natronlauge zu neutralisieren.

Hätte ein gegebener Harn die Temperatur um 4° C während eines Zeitraumes von 5 Stunden herabgesetzt, so wäre $S = \frac{40 . 300}{2} = 6000$. Es enthält demnach der Harn in 1 *cm*³ = 3000 E.

Bei dem subkutan injizierten Tiere beobachtet man insbesondere die Injektionsstelle. Normaler Harn wird glatt resorbiert, solcher, der aus einer Periode gesteigerten Eiweißzerfalls stammt, vermag in der Regel die Kutis am Injektionsorte in wenigen Stunden unter Bildung einer Nekrose zu zerstören, welche in ihrem Aussehen und in ihrem weiteren Verlauf — Eintrocknen zu einem braunen, lederartigen Schorf, Abstoßung, Geschwürsbildung usw. — absolut jenem, als *Arthus*sches Phänomen beschriebenen gleicht. Um auch hier die Wirkungsintensität verschiedener Harne vergleichen zu können, ist es empfehlenswert, die Größe des zerstörten Hautbezirkes nach 24 Stunden zu messen bzw. festzustellen, ob der Harn glatt resorbiert wurde oder aber ein Infiltrat vorhanden ist.

Parallelversuche mit normalen Harnen werden die Differenzen der Harngiftigkeit ohneweiters erkennen lassen.

3. Nachweis einer passiven Anaphylaxie.

Sie besteht in der Übertragung einer aktiven, durch Antigeninjektionen erzeugten Überempfindlichkeit auf ein sonst unvorbehandeltes Kontrolltier durch das Serum des überempfindlichen. Wir unterscheiden dabei demnach zwei Akte: *a)* die passive Sensibilisierung, *b)* die Reinjektion.

a) Die passive Sensibilisierung. Arbeitet man innerhalb einer Tierspezies, z. B. nur mit Meerschweinchen (homologe passive Anaphylaxie), so ist die Technik der Sensibilisierung nicht wesentlich verschieden, wie wenn man von einer Tierart auf eine andere, z. B. vom Kaninchen auf das Meerschweinchen die Überempfindlichkeit überträgt (heterologe passive Anaphylaxie). Es kann demnach die Versuchstechnik beider Formen unter einem abgehandelt werden.

An die Spitze kann der Satz gestellt werden, daß die Übertragung der Anaphylaxie von einem Tiere auf ein anderes mit jedem Immunserum gelingt, welches in zureichender Menge freies Antieiweiß enthält und daß es um so leichter möglich ist, je höherwertig dieses ist. Man wird deshalb gut tun, insbesondere bei der Beantwortung prinzipieller Fragestellungen, dem anaphylaktischen Versuche eine Auswertung der Immunprodukte solcher Seren (Präzipitinreaktion, eventuell Bestimmung des hämolytischen Immunambozeptors) nach den von *L. Michaelis* in Band III 2, Seite 1185 ff. des vorliegenden Handbuches aufgestellten Grundsätzen vorauszuschicken.

Nach dem eben Gesagten sind auch die Mengen des Immunserums, welche zu einer passiven Präparierung des normalen Tieres notwendig sind, großen Variationen unterworfen und können um so kleiner gewählt werden, je höher der Antieiweißgehalt eines Serums ist. Deshalb können wir hier

auch auf eine Wiedergabe der in der älteren Literatur über passive Anaphylaxie gebräuchlichen Versuchsmengen verzichten: noch leichter in Anbetracht des Umstandes, daß ebenso maßgebend wie die Präparierung für den Nachweis des Shocks die Menge, die Art und Zeit der Prüfung, mit dem Antigen ist. Während bei dem einen Serum 0·1 *cm*³ hinreichen, um bei einer unter gleichen Bedingungen vorgenommenen Reinjektion noch stürmische Symptome hervorzurufen, sind von einem anderen 1·0—4·0 *cm*³ davon nötig. Was insbesondere das Serum von Meerschweinchen anlangt, die ein einziges Mal durch kleine Mengen Antigen aktiv sensibilisiert wurden, so ist es zur Zeit der vollentwickelten Überempfindlichkeit wohl nötig, 2·0—4·0 *cm*³ zu injizieren. *E. Friedberger* und *Burckhardt*[1]), welche in dieser Hinsicht über ganz einheitliche Resultate verfügen, verwendeten unter ihren Versuchsbedingungen immer 1·5—2·5 *cm*³.

Was die Injektionsart des Immunserums anlangt, so gelingt die passive Sensibilisierung selbstverständlich mit jeder Art der parenteralen Zufuhr. Will man rasch sensibilisieren oder verfolgt man, wie es insbesondere von *Doerr* und *Ruß*[2]) geschehen ist, spezielle Fragestellungen, so wird die Einbringung in die Vena jugularis notwendig sein. Genügt es, nach 24 Stunden erst sichere Resultate zu gewinnen, so ist die intraperitoneale Applikation vorzuziehen. Dieser Weg ist es auch, welcher in der überwiegenden Zahl der Versuche zur Präparierung eingeschlagen wurde.

Was die Wahl des Versuchstieres anlangt, so ist unter allen Umständen das hochempfindsame Meerschweinchen jedem anderen vorzuziehen, weil hier die einheitlichsten und verläßlichsten Resultate erzielt wurden. Das gilt von einer homologen Übertragung unbedingt, von einer heterologen jedoch nur bedingungsweise.

Es haben nämlich seither vielfach bestätigte Versuche von *Uhlenhuth* und *Haendel*[3]) weiter erwiesen, daß ein vom Huhn stammendes Immunserum Meerschweinchen nicht überempfindlich machen konnte. Daß auch die Umkehrung des Versuches nicht gelingt, zeigte *Friedberger*[4]): Er vermochte mit einem Immunkörper von Kaninchen, welcher Meerschweinchen in vorzüglicher Weise sensibilisierte, an Vögeln nur zu negativen Resultaten zu gelangen. Der Grund für diese Erscheinung ist offenbar darin gegeben, daß die Immunkörper, welche von einer, dem Wirtstiere fernestehenden Spezies stammen, in ihm keine geeignete, in ihre zytophilen Gruppen einpassende haptophore Gruppe besitzen.

Man wird also, wenn man das passiv-anaphylaktisierende Verhalten eines, von einer bestimmten Tierart stammenden Serums mit Aussicht

[1]) l. c.

[2]) *Doerr* und *Ruß*, Studium über Anaphylaxie. 2. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 2. H. 1. pag. 109. Ebenda: Studien über Anaphylaxie. 3 u. 4. Bd. 3. H. 2. pag. 181 und 7. 1909. pag. 706.

[3]) *Uhlenhuth* und *Haendel*, Untersuchungen über die praktische Verwertbarkeit der Anaphylaxie etc. Zeitschr. f. Immunitätsforschg. Bd. 4. H. 6. pag. 761. 1909.

[4]) *E. Friedberger* und *Burckhardt*, l. c.

auf Erfolg studieren will, dieses an gleichartigen, oder aber an nahe verwandten, insbesondere aber an einer empfindlichen Spezies studieren müssen. Stammt der Immunkörper, wie im Falle *Uhlenhuths* und *Haendels*, von Vögeln, so wird man Vögel als Wirtstiere für ihn benutzen; stammt er vom Kaninchen, so wird man, was der allgemeinen Gepflogenheit entspricht, das hochempfindliche Meerschweinchen heranziehen.

Ist dabei der Fall gegeben, daß das Serum der auf das Vorliegen aktiver Anaphylaxie zu prüfenden Spezies auf das Meerschweinchen toxisch wirkt, so kann man diesen, die Versuchstiere stark schädigenden, auf die hämolytische Eigenwirkung zurückzuführenden Faktor durch vorhergehende Inaktivierung der Seren bei 57° ausschalten, ohne dadurch das passive Sensibilisierungsvermögen wesentlich zu beeinträchtigen. Das gilt insbesondere für die Übertragung einer Anaphylaxie vom Menschen auf das Meerschweinchen, die sicher möglich ist.

b) Die Reinjektion: Für die Dosierung und die Applikationsart jenes Antigens, mit welchem die aktive Anaphylaxie erzeugt wurde und dessen Wirksamkeit im passiv anaphylaktischen Versuche dargetan werden soll, gelten dieselben Regeln und Vorschriften wie bei der aktiven Anaphylaxie. Ich verweise diesbezüglich auf das dort Gesagte.

Nähere Angaben sollen nur über die Zeit gemacht werden, welche zwischen der Präparierung und der Prüfung der Tiere vergehen muß, damit man sicher positive Resultate erhält.

Dazu ist es notwendig, daß der bei der Sensibilisierung einverleibte Immunkörper an die Zellen des Tieres verankert wird.

Soll die Sensibilisierung sowohl wie die Reinjektion von der Blutbahn aus vorgenommen werden, so genügt, wie das die Versuche von *Doerr* und *Ruß* gelehrt haben, schon ein Zwischenraum von 4 Stunden, um deutliche Ausschläge zu bekommen, jedoch war nach 12 Stunden das Maximum der Reaktionsfähigkeit erreicht. Bei intraperitonealer Versuchstechnik, die sich insbesondere beim Arbeiten mit dem anaphylaktischen Temperatursturz empfiehlt, ist bei homologer Übertragung mindestens ein Zeitraum von 24, besser von 48 Stunden zu fordern, bei heterologer oft erst nach 72 Stunden das Versuchsoptimum erreicht. Einschlägige noch unveröffentlichte Versuche bringt die nebenstehende Tabelle 4.

Zur passiven Sensibilisierung dienten hier die Seren von Kindern, die im Gefolge einer Diphtherie-Antitoxinbehandlung größere Mengen Pferdeserum erhalten hatten und dagegen überempfindlich geworden waren. Vorbehandlung und Reinjektion erfolgten intraperitoneal. Die weiteren Details des Versuches ergeben sich aus der Tabelle.

Der Effekt der Reinjektion ist, wenn die Übertragung der Anaphylaxie gelungen war, ein echter anaphylaktischer Shock. Seine Beurteilung als echte passiv anaphylaktische Erscheinung unterliegt denselben Kriterien, wie diese früher schon für die aktive Anaphylaxie ausgeführt wurden.

Es verdient hier nur noch hervorgehoben zu werden, daß insbesondere in Fällen, wo die aktive Anaphylaxie des Serumspenders, wie z. B.

bei Versuchen vom Menschen auf das Meerschweinchen, nicht sichergestellt ist, es unbedingt notwendig ist, Kontrollversuche in der Weise anzustellen, daß man eine Anzahl von Meerschweinchen mit dem Serum sicher normaler, nicht anaphylaktischer Individuen in denselben Mengenverhältnissen und zu der gleichen Zeit vorbehandelt und reinjiziert, wie dies in der folgenden Tabelle geschehen ist. Sollten solche Tiere ein anderes Verhalten bei der Reinjektion zeigen als unvorbehandelte, so ist ihre Reaktion von jener der sensibilisierten als nicht spezifisch in Abzug zu bringen.

Eine neuerliche Überprüfung der gewonnenen Resultate auf das Vorliegen einer Antianaphylaxie bei den überlebenden Tieren wird in allen solchen Fällen von Vorteil sein.

Tabelle 4.

Vorbehandlung	Intervall	Reinjektion	Temperatur	Zeit	Absoluter Shock	Reduzierter Shock
Pat. Ser. 1. 2 cm^3	24 St.	2 cm^3 PfSe. in.	5	120	300	154
„ „ 2. 3 „	„	„	43	330	7095	6949
„ „ 3. 3 „	72 St.	„	25	420	5250	5104
„ „ 3. 2 „	„	„	15	270	2025	1879
„ „ 4. 3 „	48 St.	„	10	100	500	354
Normalserm 3 „	„	„	5	45	112	—
„ 3 „	„	„	6	60	180	—
—	—	„	0	0	0	—
—	—	„	0	0	0	—

c) Die Maßmethoden des Immunkörpers (Methoden von *R. Doerr* und *V. K. Ruß*[1]). Es kann unter Umständen, insbesondere bei speziellen Fragestellungen von Wert sein, das passive Sensibilisierungsvermögen eines Serums, demnach seinen Gehalt an frei kursierendem Antieiweiß zu bestimmen. Dies ist unter Beobachtung der übrigen schon erörterten Kautelen nach *R. Doerr* und *V. K. Ruß* mittelst der folgenden Methoden möglich:

α) Maßmethode bei konstantem Immunkörper und fallenden Antigenmengen. Man injiziert einer größeren Anzahl von gleich schweren und normalen Meerschweinchen eine konstant bleibende Menge des zu untersuchenden Immunserums (je 1 cm^3 eines hochwertigen wie z. B. präzipitierenden Kaninchenserums) intraperitoneal und prüft 24 Stunden darauf die passiv anaphylaktisch gewordenen Tiere durch intravenöse Einbringung fallender Mengen des korrespondierenden Eiweißantigens. Die kleinste noch tödlich wirkende Dosis der Reinjektion gibt einen Vergleichspunkt und demnach auch ein Maß für die Menge des einverleibten Immunkörpers.

[1]) l. c.

β) Das Prinzip der fallenden Immunkörper- und konstanten Antigenmenge. Auch die Umkehrung dieser Versuchsanordnung ist praktisch brauchbar. Behandelt man mit fallenden Mengen eines Immunkörpers vor (1·0—0·1 *cm*³ intraperitoneal) und reinjiziert intravenös nach 48 Stunden konstante Antigenmengen (1·0 *cm*³), so gibt den Schwellenwert und Vergleichspunkt die kleinste Immunserummenge, mit deren Vorbehandlung die gewählte Eiweißmenge der Reinjektion eben noch zu töten vermag.

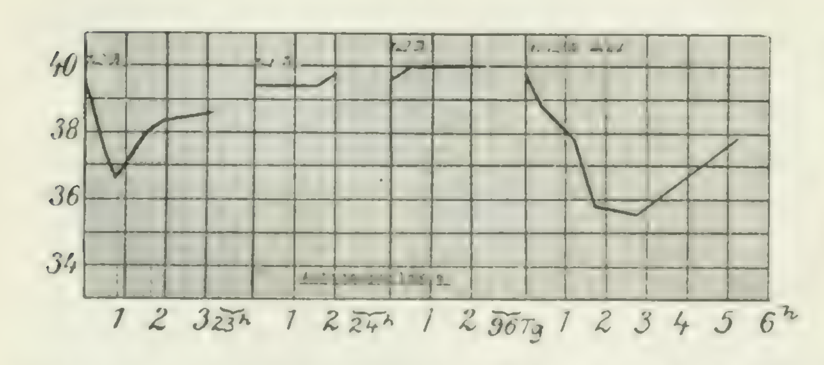
Von der dritten Methodik — partielle Absättigung des Antieiweiß — kann hier füglich abgesehen werden.

Von den hier wiedergegebenen hat sich die erste und zweite Technik am besten bewährt. *Doerr* und *Ruß* schlagen als anaphylaktische Immuneinheit ein Serum vor, von dem 1·0 *cm*³ intraperitoneal injiziert ein Meerschweinchen von 250 *g* so empfindlich macht, daß 0·2 *cm*³ Antigen nach 24 Stunden intravenös nachgespritzt gerade noch akuten Tod auslösen. Dies wäre das einfache Serum. Im Verhältnis zu ihm wäre ein zweifaches so beschaffen, daß mit 1·0 *cm*³ vorbehandelte Meerschweinchen schon auf 0·1 *cm*³ Serum akut verenden, ein hundertfaches ein solches, welches mit 0·002 *cm*³ Antigen einen tödlichen Effekt erzielt usw.

4. Der Nachweis einer Antianaphylaxie.

Arbeitet man bei der Auslösung des anaphylaktischen Shocks unter Versuchsbedingungen, welche die Kontrolltiere gar nicht schädigen, so sind die Ergebnisse einer neuerlichen Reinjektion zur Feststellung einer Antianaphylaxie leicht zu beurteilen. Waren bei der ersten Reinjektion die Krankheitserscheinungen schwere und fehlen sie hier, so darf unzweifelhaft das Ausbleiben der Reaktion auf Antianaphylaxie zurückgeführt werden, welche in dem supponierten Falle eine komplette ist.

Fig. 140.



Ein mit Hilfe des Temperatursturzes gewonnenes Beispiel dieser Art bringt Fig. 140, welche ich einer Arbeit von *H. Pfeiffer* und *S. Mita* (l. c.) entnehme:

Ein Meerschweinchen, welches mit Rinderserum sensibilisiert worden war, reagiert auf die Einverleibung von 1 *cm*³ inaktivierten, für die Kontrollen völlig unwirksamen Rinderserums mit einer Temperaturabnahme von 3°. Als es 24 und 48 Stunden später neuerlich 1 *cm*³ Rinderserum erhält, fehlen alle Krankheitserscheinungen, seine Temperatur bleibt in durchaus normalen Grenzen. (Die vierte dieser Kurven wurde 96 Tage später gewonnen und zeigt den neuerlichen Eintritt der Überempfindlichkeit.)

Was die hier einzuhaltende Versuchstechnik anlangt, so sind dieselben Mengen desselben Injektionsmaterials auf demselben Versuchswege einzuspritzen, mit welchem der anaphylaktische Shock ausgelöst wurde. Hinsichtlich des Zeitraumes, welcher vergehen muß, damit eine Antianaphylaxie sich ausbilden kann, so ist dieser bei intravenöser Methodik kürzer als bei intraperitonealer, hängt übrigens aber auch von der Menge des bei der Probeinjektion einverleibten Antigens und von der Reaktionsfähigkeit des Tieres ab. Im allgemeinen kann man sagen, daß bei intra-

Tabelle 5.

Entwicklung der Antianaphylaxie.

Tier	Tag	Vorbehandlung Pferdeserum	Intervall	Reinjektion Pferdeserum	Temperaturabnahme in Zehntelgraden	Erholung nach Minuten	$S = \frac{ta \cdot Z}{2}$
1.	XI. 09	0·01	25 Tg.	1·5	61	360	10.980
			24 St.	1·5	6	60	180
2.	XI. 09	0·01	25 Tg.	1·5	56	450	12.600
			24 St.	1·5	12	180	1.080
3.	XI. 09	0·01	25 Tg.	1·5	30	420	6.300
			24 St.	1·5	13	120	780
4.	XI. 09	0·01	25 Tg.	1·5	69	540	18.630
			24 St.	1·5	10	180	900
			24 St.	1·5	0	0	0
5.	XI. 09	0·01	25 Tg.	1·5	41	450	9.225
			24 St.	1·5	4	60	120
			24 St.	1·5	2	30	30
6.	XI. 09	0·01	25 Tg.	2·0	92	480	22.080
			24 St.	2·0	24	180	2.160
			24 St.	2·0	0	0	0
7.	XI. 09	0·01	25 Tg.	2·0	72	660	23.760
			24 St.	2·0	10	180	900

venöser Injektion schon nach 2—4 Stunden eine ausgesprochene Abnahme der Überempfindlichkeit nachweisbar sein kann. Es hat sich aber auch hier ganz allgemein die Gepflogenheit herausgebildet, 12—24 Stunden vergehen zu lassen, bis man eine neuerliche Injektion vornimmt, was schon deshalb empfehlenswert ist, um einen anaphylaktischen Shock sicher abklingen zu lassen. Hat man den intraperitonealen Versuchsweg eingeschlagen, so möge nie vor 24 Stunden geprüft werden, besser ist es noch, wenn man recht bedeutende Reaktionsunterschiede erzielen will, selbst 48 Stunden zwischen beiden Einspritzungen verstreichen zu lassen. Selbst dann wird man nicht immer komplette Antianaphylaxien erwarten dürfen.

sondern nur durch eine quantitative Abschätzung der Resultate den Eintritt einer partiellen Unempfindlichkeit feststellen können. Daß auch dafür die Methodik des anaphylaktischen Temperatursturzes besonders geeignet ist, liegt auf der Hand. Die beigegebene Tabelle 5 (einer Arbeit von *S. Mita* entnommen) wird dies besser als Worte illustrieren.

War das Antigen der Reinjektion nicht völlig unschädlich für die normalen Kontrollen, so ist die Beurteilung des Ergebnisses einer neuerlichen Einspritzung viel schwieriger, weil, wie eingangs erörtert, neben der auf den Verbrauch von Immunkörpern zurückzuführenden Antianaphylaxie auch noch die verminderte Reaktionsfähigkeit in Betracht kommen kann. Reagieren aber die sensiblen Tiere auf ein an sich toxisches Antigen bei der neuerlichen Reinjektion beträchtlich schwächer als das erstemal, hingegen stärker als die unvorbehandelten Kontrollen, so kann man diesen Ausfall ohne weiteres auf Antianaphylaxie beziehen. Hätte z. B. ein gegen Rinderserum sensibilisiertes Tier auf 1·0 *cm*³ mit 4000 Einheiten reagiert, die unvorbehandelte Kontrolle mit 250 Einheiten, wären demnach bei einem reduzierten Shock das erstemal 3750 Einheiten nachweisbar gewesen und reagiert es neuerlich auf 1·0 *cm*³ mit 400 Einheiten, so sind davon 150 auf ein partielles Erhaltenbleiben der Überempfindlichkeit, die Differenz gegen 3750 = — 3600 E. als Antianaphylaxie zu deuten.

Endlich sei noch ein Beispiel verminderter Reaktionsfähigkeit (nach *H. Pfeiffer* und *S. Mita*) angeführt, aus welchem sich auch die Methodik solcher Versuche ohne weiteres ergibt.

10 Meerschweinchen, welche mit 0·01—0·0001 Rinderserum vor 21 Tagen sensibilisiert worden waren, erhielten nach dieser Zeit intraperitoneal je 2 *cm*³ völlig inaktivierten, für die Kontrollen gänzlich unschädlichen Materials und reagierten darauf mit sehr beträchtlichen Shockgrößen bis zu 13.730 E., die demnach restlos als echte anaphylaktische Ausschläge gedeutet werden müssen. Die zweite Reinjektion erfolgte 2 Tage später mit 2·0 *cm*³ ganz frischen, aktiven Rinderserums, welches unvorbehandelte Tiere des gleichen Gewichtes im Durchschnitte mit 18.000 E. schädigte. Die antianaphylaktischen Tiere waren aber nunmehr gegen die ihnen einverleibte große Giftdosis entweder vollkommen oder nahezu vollkommen refraktär und lieferten einen Mittelwert von 573 E. Sie waren, wenn man die 73 E. vernachlässigt, 36mal weniger empfindlich gegen die Hämolysinwirkung als normale Tiere. Es ist einleuchtend, daß dieses Resultat nicht allein aus einer Antianaphylaxie, sondern auch aus dem durch eine verminderte Reaktionsfähigkeit erklärt werden muß.

5. Der Nachweis organspezifischer Reaktionen.

Solche wurden zuerst von *Kraus, Dörr* und *Sohma* [1]), *Andrejew* [2]) mit dem Linseneiweiß, *H. Pfeiffer* [3]) mit Erythrozyten und Linsen. *H. Pfeiffer*

[1]) *Kraus, Dörr* und *Soma*, Wiener klin. Wochenschr. 1908. Nr. 30. pag. 1084.

[2]) *Andrejew*, Über Anaphylaxie mit Eiweiß tierischer Linsen. Arbeiten a. d. kaiserl. Gesundheitsamte. 1909. Bd. 30. H. 2.

[3]) *H. Pfeiffer*, Über den anaphylaktischen Temperatursturz usw. Sitzungsbericht d. kaiserl. Akademie d. Wissenschaften in Wien. 1909. Abt. III. Bd. 118.

und *S. Mita* [1]) mit Eiklar, Spermatozoen und von *H. Pfeiffer* [2]) mit Niereneiweiß ausgeführt. Dabei handelt es sich um den Nachweis verschiedener von einer bestimmten Tierart stammender Eiweißkörper. Diese können wieder artfremde, oder arteigene, ja arteigene und körpereigene, dabei aber blutfremde sein.

Was die Durchführung solcher minutiöser Versuche anlangt, so ist eine möglichste Reinheit sowohl des Eiweißes der Vorbehandlung, als von jenem der Reinjektion Grundvoraussetzung für klare Ergebnisse. Diese Forderung kann für das Eiweiß isoliert zu gewinnender Zellen leicht durch wiederholtes Waschen in der Zentrifuge und Wiederersatz der Kochsalzlösung erreicht werden. Dies gilt insbesondere für Erythrozyten und Spermatozoen. Will man spezielle Hämoglobinanaphylaxie erzeugen, so kann man nach *A. Kleins* [3]) Präzipitinversuchen so vorgehen, daß man die gewaschenen Erythrozyten in Wasser löst und durch nachträgliches Aussalzen mit Kochsalz die Stromata zur Ausfällung bringt. Diese können dann wieder durch wiederholtes Waschen von dem anhaftenden Hämoglobin befreit und zur Sensibilisierung verwendet werden. Handelt es sich um Zellen von Organen oder Geweben, so ist ihre „Reindarstellung" wohl unmöglich, da man immer undifferenzierte Zellelemente mitinjizieren muß. Gerade hier aber ist es notwendig, um nicht die feineren Differenzen in den Reaktionen zu verwischen, so lange den fein verriebenen Organbrei in der Zentrifuge wiederholt zu waschen, bis die darüberstehende klare Flüssigkeit jede Rotfärbung verloren hat.

Handelt es sich um die Untersuchung von artfremdem Material, so ist der „Ictus immunisatorius" meist groß genug, daß eine einmalige Injektion mittlerer Dosen (z. B. 1 cm^3 einer 10%igen Blutlösung) zu deutlich entwickelten Anaphylaxien führt. Soll aber mit artgleichem Eiweiß gearbeitet werden, so tritt die Überempfindlichkeit oft erst nach mehrfacher Injektion deutlich in die Erscheinung. Die Präparierung ist dann 2—3mal mit nicht zu großen, gleichfalls mittleren Mengen in Abständen von mehreren Tagen auszuführen.

Hinsichtlich des günstigsten Zeitpunktes der Reinjektion liegen die Verhältnisse hier etwa so, wie bei schwach anaphylaktogen wirkendem Eiweiß überhaupt, so daß vor dem 21. Tage wohl keine deutlichen Ausschläge zu erwarten sind. Es versteht sich von selbst, daß auch das Eiweiß für die Reinjektion ebenso zu behandeln ist als jenes bei der Sensibilisierung.

Im übrigen gelten für solche Versuche die allgemeinen, oben fixierten Regeln, die hier besonders strenge gehandhabt werden müssen. Nur von einer quantitativen Durchführung der Versuche sind auch deutliche Unterschiede in den Reaktionen der Tiere zu erwarten. Auch hier hat sich das

[1]) l. c.

[2]) *H. Pfeiffer,* Zur Organspezifität der Überempfindlichkeit. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 8. H. 3. 1910. pag. 358.

[3]) *A. Klein,* Über Erythropräzipitine etc. Zentralbl. f. Bakteriologie. Abt. 1. 1905 Bd. 39. Nr. 3. pag. 303.

Arbeiten mit der früher skizzierten Größenbestimmung des anaphylaktischen Shocks aufs beste bewährt. (Vgl. dazu z. B. die gründlichen Versuche von *E. Krusius* mit Linseneiweiß etc.) Dabei ist zu bedenken, daß, insbesondere was die intraperitoneale Reinjektion anlangt, das erste Auftreten und der Ablauf der Krankheitserscheinungen dann ein verlangsamter ist, wenn Organbrei oder Zellemulsionen verwendet werden. In solchen Versuchen bedarf es offenbar längerer Zeit, bis aus diesen im Tierleibe das wirksame Zelleiweiß in Freiheit gesetzt wird und in Reaktion treten kann. Es versteht sich von selbst, daß unter den eben erwähnten Versuchsbedingungen die Einführung der Aufschwemmung in die Blutbahn wegen der Bildung von Zellembolien zu schweren Fehlschlüssen Anlaß geben kann, die Einspritzung in die Bauchhöhle daher unter allen Umständen vorzuziehen ist. Wünscht man aber dennoch aus bestimmten Gründen die Blutbahn für den Versuch zu benützen, so kann man sich noch in der Weise helfen, daß man den gewaschenen Zellbrei bei hohem Druck in einer Buchnerpresse auspreßt, die Preßsäfte von Zelltrümmern und Sand in der Zentrifuge befreit und die nunmehr geklärte Flüssigkeit für die Injektion verwendet. Ausgiebige Kontrollen an unvorbehandelten Tieren sind selbstverständlich auch hier absolut notwendig.

Ein Beispiel einer spezifischen Rinder-Erythrozyten- und Serumanaphylaxie bei Meerschweinchen ergibt die folgende, der mehrfach erwähnten Arbeit von *H. Pfeiffer* und *S. Mita* entnommene Zusammenstellung der Mittelwerte der erhaltenen Reaktionen; es reagierten:

Erythrozytentiere auf Erythrozytenlösung (in an sich unschädlichen Dosen) mit . . . . 1.620 E. im Mittel
Serumtiere auf Erythrozytenlösung mit . . . . . 30 E. „ „
Serumtiere auf Serum (in an sich unschädlichen Dosen) mit . . . . 22.410 E. „ „
Erythrozytentiere auf Serum mit . . . . 11.040 E. „ „

Während also die mit Blutkörperchenlösungen normal vorbehandelten Tiere gegen die Wiedereinbringung desselben Materiales 54mal empfindlicher waren als die mit Serum sensibilisierten, reagierten die Hämoglobintiere auf Serum nur halb so stark als Serumtiere. Vgl. übrigens dazu die unter Maßmethoden des anaphylaktischen Shocks gebrachten Beispiele von Linsenanaphylaxie.

Um das Sensibilisierungsvermögen körpereigener und blutfremder Eiweißkörper zu prüfen, ging *Andrejew* für das Linseneiweiß so vor, daß er eine der beiden Augenlinsen verwendete und mit der zweiten dann sensibilisierte. Verfasser wies in Gemeinschaft mit *Hertle*[1]) die anaphylaktogenen Eigenschaften von körpereigenem Nieren- und Hodeneiweiß nach, indem eine Niere oder beide Hoden zerquetscht und dann in die freie Bauchhöhle reponiert wurden. Nach 3 Wochen ergab die Reinjektion deut-

[1]) *Hertle* und *H. Pfeiffer*, Über Anaphylaxie gegen artgleiches, blutfremdes Eiweiß. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 1911. Im Druck.

liche anaphylaktische Ausschläge. In ähnlicher Weise könnte mit anderen drüsigen Organen verfahren werden.

6. Der Nachweis von Anaphylatoxin (E. Friedberger).

Von besonderer Bedeutung für die Anaphylaxieforschung sind in letzterer Zeit die Reagenzglasversuche geworden, unter ihnen wieder der von *E. Friedberger* [1]) zuerst erbrachte Nachweis, daß beim Zusammentreffen von Ambozeptor, Komplement und Antigen ein Gift in vitro sich bilde, welches akut unter den Erscheinungen des anaphylaktischen Shocks die Tiere zu töten vermag. Die dabei gebräuchliche Versuchstechnik, bei deren Wiedergabe wir uns an die Angaben *E. Friedbergers* anlehnen, ist die folgende:

Bei der Gewinnung von Anaphylatoxin aus Eiweißlösungen spielen, wie *E. Friedberger* und *C. Vallardi* [2]) zuerst erkannten, folgende Faktoren eine Rolle, deren genaue Berücksichtigung eine conditio sine qua non für die Erzielung giftiger Abgüsse bildet: Die Beschaffenheit (Wertigkeit) und Menge des Ambozeptors (also des Immunserums), die Antigenmenge, die Komplementmenge und endlich die Zeitdauer sowie die äußeren Bedingungen ihres gegenseitigen Aufeinanderwirkens. Als optimal hat sich den Autoren die nachfolgende Versuchsbedingung erwiesen:

Bereitung der Antisera: Kaninchen erhalten pro Kilogramm Körpergewicht 1 cm^3 Hammelserum intravenös eingespritzt. Nach 5 Tagen wird die Injektion wiederholt und nach weiteren 7—8 Tagen eine Blutprobe aus der Ohrvene entnommen. Wenn das Serum Hammeleiweiß mindestens 1:10.000 in wenigen Minuten bei Zimmertemperatur präzipitiert, wird das Tier entblutet, das Serum abgeschieden und kurze Zeit bei 56° inaktiviert. Ein zu langes Inaktivieren schädigt die Giftbildung ganz enorm, muß daher vermieden werden.

Giftdarstellung: Mengen von je 2 cm^3 des präzipitierenden Immunserums werden mit je 1 cm^3 in gleicher Weise inaktivierten Hammelserums versetzt. Die Proben kommen auf eine Stunde in den Brutschrank und werden dann noch 24 Stunden bei Zimmertemperatur im Dunklen stehen gelassen. Am nächsten Tage werden die Präzipitate von der darüberstehenden Flüssigkeit abzentrifugiert, einmal, oder besser noch mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung zur Entfernung der letzten, an sich giftig wirkenden Antiserumspuren gewaschen und mit je 3 cm^3 frischen Meerschweinchenkomplements versetzt. Zur Gewinnung des Komplements sollen selbstverständlich nur ungebrauchte, am besten 300—350 *g* schwere Meerschweinchen ausgeblutet und ihr Serum sofort verwendet werden. Die Mischung von Präzipitat und Komplement wird wieder eine Stunde bei 37° und weitere 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, zentrifugiert und der Abguß, welcher das freie Anaphylatoxin enthält, auf seine

[1]) *E. Friedberger*, Weitere Untersuchungen über Eiweißanaphylaxie. Zeitschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 4. H. 5. pag. 636.

[2]) *E. Friedberger* und *C. Vallardi*, Über Anaphylaxie. 8. Mitt. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 7. H. 1/2. pag. 94.

Giftigkeit an Meerschweinchen von 200—250 *g* bei intravenöser Einspritzung geprüft, und zwar in Mengen von durchschnittlich 3 cm^3. Die Flüssigkeit muß langsam und unter stetem Druck in die Halsvene aus der Spritze entleert werden.

In den Fällen, wo eine Antigen-Antikörperverbindung zuerst kein Gift liefert, gelingt es oft noch durch eine zweite oder dritte Digerierung mit neuen Komplementmengen Gifte abzuspalten.

Im Folgenden sei eine übersichtliche Zusammenstellung eines solchen Versuches aus der Arbeit von *E. Friedberger* und *C. Vallardi* abgedruckt, welche zugleich die Bedeutung wechselnder Ambozeptormengen anschaulich macht:

Tabelle 6.

Hammelserum in 2 cm^3	Präzipit. Kaninchenserum	Komplementdosis	Resultat
1:0	2·0 cm^3	3·0 cm^3	gesund
1:1	2·0 „	3·0 „	anaphylaktisch
1:10	2·0 „	3·0 „	tot
1:100	2·0 „	3·0 „	„
1:0	2·0 „	3·0 „	gesund
1:1	2·0 „	3·0 „	anaphylaktisch
1:10	2·0 „	3·0 „	„
1:100	2·0 „	3·0 „	tot
1:1.000	2·0 „	3·0 „	leicht anaphylaktisch
1:10.000	2·0 „	3·0 „	gesund
1:100.000	2·0 „	3·0 „	„

Bei dieser Versuchsanordnung wird man, um die erhaltenen Resultate mit Bestimmtheit auf Anaphylatoxinbildung zurückführen zu dürfen, gut daran tun, wie es in *Friedbergers* Versuchen immer geschehen ist, in gleich großen Versuchsmengen das verwendete Komplement für sich an Kontrolltieren auf ihm etwa eignende Giftwirkungen zu prüfen. Solche wurden übrigens bisher noch nie vorgefunden. Auch eine Prüfung des verwendeten Antiserums auf seine Giftigkeit ist zu Kontrollzwecken anzuraten, obwohl es ja durch das wiederholte Waschen der Präzipitate entfernt wurde und für die Giftwirkung des Abgusses nicht in Betracht kommt. Sie ist eine oft recht hohe und wesensgleich mit der des Anaphylatoxins.

Auf diesen eben besprochenen Versuchswegen konnten bisher mit verschiedenen Serumarten, Blutschatten und Hämoglobinlösungen giftige Spaltprodukte nachgewiesen werden. Bei Versuchen mit letzteren muß man nach *Friedberger* und *Vallardi* die toxische Eigenwirkung des Hämoglobins mit in Betracht ziehen.

In prinzipiell derselben Weise gelingt es, aus den verschiedenartigsten Bakterienzellen, lebenden und abgetöteten, akut tödlich wirkendes Anaphylatoxin durch Einwirkung von Immunseren zu gewinnen. Hier ist übrigens schon normales aktives Meerschweinchenserum an sich, und das vermöge seines natürlichen Gehaltes an Ambozeptoren geeignet, hinreichende Giftmengen zu liefern, worauf später des Näheren eingegangen

werden soll. Bei solchen Versuchen können die Bakterien sowohl im lebenden als im abgetöteten oder gekochten Zustande verwendet werden. Es ist selbstverständlich, daß solche Stämme hinsichtlich ihrer Virulenz usw. im Tierversuch genau ausgewertet sein müssen. Zur Giftbildung verwendeten *E. Friedberger* und seine Mitarbeiter[1]) bisher Vibrio Metschnikoff (im Chloroformdampf abgetötet), Typhusbazillen (3tägige Agarkultur), Prodigiosus (24 Stunden alte Schrägagarkultur), Tuberkelbazillen (üppig gewachsene Schrägagarkultur), Staphylococcus pyogenes aureus (24 Stunden alte Schrägagarkultur). Die Bakterien werden entweder nach vorheriger Abtötung im Dampfstrom, durch direktes Kochen oder durch Chloroformdämpfe in bestimmter Menge in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und gewaschen, dann mit dem Immunserum meist 18—24 Stunden in Kontakt gelassen. Dabei findet die Verankerung der Ambozeptoren an die Bakterienzellen statt. Sodann werden die beladenen Bazillen mit reichlichen Mengen physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um Überschuß von Ambozeptorenserum zu entfernen, die eine Komplementablenkung hätten bedingen können. Die gewaschenen Bakterienleiber werden dann in der Regel mit 4 cm^3 normalen und frischen Meerschweinchenkomplements versetzt und nach 24stündigem Aufenthalt im Eisschrank oder bei Zimmertemperatur im Dunklen abzentrifugiert. Der Abguß wird normalen Meerschweinchen intravenös injiziert und diese mit der bei Anaphylaxieversuchen üblichen Methodik auf Krankheitserscheinungen geprüft. Die Injektion der Abgüsse muß stetig und langsam in die Vena jugularis vorgenommen werden. Schwangere Tiere oder solche, die kurz vorher geboren haben, sind für solche Versuche nicht verwendbar. In der jüngsten Zeit hat es sich denselben Autoren ergeben, daß auch normales Meerschweinchenserum an sich — bestimmte Versuchsbedingungen vorausgesetzt — geeignet ist, vermöge seines normalen Gehaltes an Antikörpern aus Bakterien akut wirksames Anaphylatoxin abzuspalten. Die im Folgenden abgedruckten Versuchsparadigmen mögen einen Einblick in die Mengenverhältnisse sowohl beim Arbeiten mit Immun- als auch mit normalen Ambozeptoren allein geben. Sie sind den Arbeiten von *E. Friedberger* und *Goldschmidt* (l. c.) bzw. *E. Friedberger* und *Schütze* (l. c.) entnommen.

Bestimmung der Giftigkeit der Bazillen: Je ein Drittel dreitägiger Typhus-Schrägagarkultur wird in 4 cm^3 destillierten Wassers aufgenommen und $1^1/_2$ Stunden im Schüttelapparat geschüttelt.

Ein Meerschweinchen erhält die gesamte Aufschwemmung, nachdem die Flüssigkeit auf 0·8% Kochsalz gebracht worden ist, intravenös. Abgesehen von geringer Atembeschleunigung keine Symptome.

Anaphylatoxinbildung: Je $^1/_2$ einer dreitägigen Typhus-Schrägagarkultur wird in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, mit fallenden Mengen von Typhusimmunserum vom Pferde versetzt. Alle Röhrchen, auf 10 cm^3 aufgefüllt, kommen eine Stunde in den Thermostaten von 37°, dann 24 Stunden in den Eisschrank. Die Bazillen werden dann abzentrifugiert, sorgfältig gewaschen, mit je 4 cm^3 normalen Meerschweinchenserums versetzt. Am folgenden Tage Prüfung der Komplementabgüsse wie folgt:

[1]) *E. Friedberger* und seine Mitarbeiter, Über Anaphylaxie. 12.—15. Mitt. Zeitschrift f. Immunitätsforsch. 1911. Bd. 9. H. 3. pag. 369

Versuch	Kulturmenge	Immunserum	Komplement	Menge des Abgusses injiziert	Krankheitsverlauf	Ausgang
1	1/2 Kultur	0·05	4·0	4·0	deutliche Anaphylaxie	erholt sich
2	1/2 „	0·1	4·0	4·0	sehr schwere Anaphylaxie	Tod in 4 Stunden
3	1/2 „	0·25	4·0	3·5	„ „ „	„ „ 22 „
4	1/2 „	0·5	4·0	4·0	„ „ „	erholt sich
5	1/2 „	1·0	4·0	4·0	„ „ „	Tod in 2 Stunden
6	1/2 „	2·5	4·0	4·0	„ „ „	„ „ 2 „
7	1/2 „	5·0	4·0	3·0	keine Erscheinungen	lebt
8	1/2 „	10·0	4·0	4·0	leichte „	„

Der Versuch läßt deutlich erkennen, wie auch hier ein Überschuß an Immunserum ungünstig für die Giftabspaltung ist.

Bereitung von Anaphylatoxin mit Normalserum: 0·2 *g* Tuberkelbazillen werden in 10 *cm*³ 0·85⁰/₀iger Kochsalzlösung fein verrieben und suspendiert, so daß 1 *cm*³ = 0·01 *g* Bazillen enthält. Hiervon werden verschiedene Verdünnungen mittelst physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und die Bakterien mit normalem Meerschweinchenkomplementserum versetzt. Nach 16—18 Stunden langem Stehen bei 15⁰ wird zentrifugiert und die Abgüsse intravenös geprüft:

Nr.	Kulturmenge	Komplementmenge	Injektionsdosis	Ausgang
1	0·02	4·2	4·2	Tod nach 34 Minuten
2	0·01	3·5	3·5	Tod nach 12 Stunden
3	0·002	4·5	4·5	Leichte Erscheinungen, überlebt
4	0·001	4·5	4·5	Keine Erscheinungen, lebt.

7. Der Nachweis des spezifischen Abbauvermögens von Seren anaphylaktischer Meerschweinchen.

a) Durch den Nachweis inkoagulabler Spaltprodukte von Peptoncharakter: Speziell für den Fall der Eiweißanaphylaxie haben *H. Pfeiffer* und *S. Mita*[1]) zuerst bewiesen, daß bei der Digestion von Seren anaphylaktischer Meerschweinchen mit dem zugehörigen Antigen inkoagulable Spaltprodukte auftreten, ein Ergebnis, welches mittlerweile insbesondere durch die *Friedberger*sche Schule mit vollem Erfolge auch auf den Fall der Bakterienanaphylaxie und der Anaphylatoxinbildung überhaupt ausgedehnt worden ist. Gleichzeitig und völlig unabhängig von diesen Resultaten und mit anderer Versuchstechnik hat *E. Abderhalden*[2]) den Nachweis des Auftretens proteolytischer Fähigkeiten in den Seren von mit Ei-

[1]) *H. Pfeiffer* und *S. Mita*, Vorträge in der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in Graz. 25. XI. 1909, dann: Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der Eiweiß-Antieiweißreaktion. Zeitschr. f. Immunitätsforschg. Bd. 6. H. 1. 1910. pag. 18.

[2]) *E. Abderhalden* und *Pinkussohn*, Zeitschr. f. physiologische Chemie. Bd. 64. pag. 100. 1910 (bei der Redaktion eingegangen am 6. XII. 1909).

weiß vorbehandelten Tieren erbracht und ihn später auch auf den Fall der Eiweißanaphylaxie ausdehnen können.

H. Pfeiffer und *S. Mita* verfuhren wie folgt: Nachdem weder die Enteiweißungsmethode von *Devoto,* noch jene von *Michaelis* und *Rona* hier gangbar war, wählten die Verfasser die Enteiweißung durch die Hitze. Dazu muß bemerkt werden, daß, um Fehler durch mangelhafte Enteiweißung zu vermeiden, unbedingt Einübung in die Technik und sodann von vorneherein kleine Versuchsmengen notwendig sind. Sonst sind positive Biuretreaktionen auch bei den Kontrollröhrchen zu erwarten, die aber andrerseits, wie Hunderte einschlägiger Kontrolluntersuchungen gelehrt haben, bei peinlichster Einhaltung der Technik konstant vermeidbar sind. Ich betone hier neuerdings die Schwierigkeiten derartiger Versuche, auf welche jüngst auch *Schenk* hingewiesen hat. Ich glaube aber, und das im Hinblicke auf die neuesten Versuche von *E. Friedberger* und *S. Mita* und im Hinblicke auf die große Zahl unserer Kontrollversuche, jeden Irrtum methodischer Art ausschließen zu dürfen.

Die zu untersuchenden Seren und Serumgemische werden in der Menge von 4 bis höchstens 8 cm^3 mit der zehnfachen Menge destillierten Wassers verdünnt und in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade bis zu zirka 80° erhitzt. Noch besser hat sich mir in jüngster Zeit Kochen der Flüssigkeiten in Erlenmeierkölbchen in dem siedenden Wasser des Bades bewährt. Unter fortwährendem Weitererwärmen wird tropfenweise sehr stark verdünnte Essigsäure so lange zugesetzt, bis eine eben deutlich saure Reaktion gegen Lackmus nachweisbar wird, die Gerinnung des Eiweiß großflockig erfolgt, dieses sich vollständig abscheidet, die Flüssigkeit daneben vollständig wasserklar erscheint. Der Zusatz der Säure hat allmählich zu erfolgen und es erfordert wie gesagt Übung, jene notwendige Grenze der Azidität regelmäßig zu treffen, bei welcher eine vollständige Ausscheidung des Eiweiß erfolgt. Als Kriterien, daß der Zusatz der Säure in der richtigen Weise erfolgt ist, dienen, besser als das Verhalten gegen Lackmus: 1. die großflockige Ausscheidung der koagulablen Eiweißkörper; 2. die selbst bei länger fortdauerndem Erhitzen fortbestehende, vollkommen wasserklare Beschaffenheit der Flüssigkeit und 3. ihr Verhalten bei der Filtration. Sie fließt wie reines Wasser rasch durch das Filter.

Nachdem zur Vergewisserung, daß auch alles in der Hitze koagulable Eiweiß wirklich ausgefällt ist, noch durch zirka 30 Minuten weiter erhitzt worden war, wurde filtriert, das Filtrat auf die ursprüngliche Menge eingedampft und damit die Biuretprobe angestellt.

Ein vom Meerschweinchen gewonnenes Beispiel möge die übrige Versuchsanordnung klarmachen:

Vorbehandlung	Entblutet nach	Immunserum	Antigen	Präzipitat	Biuretprobe der enteiweißten Flüssigkeit
0·01 PfS.	25 Tg.	4 cm^3	2 PfSe.	—	positiv
0·01 „		4 „	2 RSe.	—	negativ
0·01 „		2 „	2 PfSe.	—	positiv
0·01 „		2 „	2 RSe.	—	negativ

Nach früheren Ergebnissen von *Abderhalden* und *Pinkussohn* gelingt es übrigens auch durch vorhergehende Digestion von Immunserum und Antigen. Dialyse der Gemische und Anstellung der Biuretprobe mit der Außenflüssigkeit den spezifischen Abbau der Gemische nachzuweisen.

b) Durch den Nachweis der Änderung im Brechungsvermögen (optische Methode nach E. Abderhalden). Die zur Beobachtung vielfacher biologischer Fragestellungen verwendete optische Methode *E. Abderhaldens* wurde in jüngster Zeit auch speziell zum Nachweise des fermentativen Abbauvermögens von Seren für den Fall einer Eiweißanaphylaxie bei Meerschweinchen und Kaninchen von ihm und *Pinkussohn* herangezogen.

Hinsichtlich der Einzelheiten der Versuchstechnik sei hier auf die wiederholten Angaben der Autoren in der Zeitschr. f. physiol. Chemie, Jahrg. 1909—1911 verwiesen. Ihr Prinzip besteht darin, daß bei der Einwirkung von Fermenten auf Lösungen eines Proteines, eines Peptones oder eines Polypeptides das ursprüngliche Drehungsvermögen des Substrates in ganz gesetzmäßiger Weise sich ändert. So kann mit einer bestimmten Fermentlösung eine typische Kurve des unter seiner Einwirkung eintretenden Abbaues erhalten werden. *Abderhalden* hebt insbesondere hervor, daß eine Verfolgung der Änderung im Drehungsvermögen der Gemische von Immunserum und Antigen nur mit sehr guten Polarisationsapparaten möglich ist. Das Auftreten von Trübungen macht die Versuchsresultate unbrauchbar. Ebenso muß die Lösung frei von zelligen Bestandteilen des Blutes sowie von Hämoglobin sein. Die Versuche werden so ausgeführt, daß in einem Polarisationsrohr eine bestimmte Menge einer Antigenlösung (z. B. Pferdeserum) eingefüllt und das entsprechende Immunserum zugesetzt wird. Nun wird das auf 37° erwärmte Rohr in den Polarisationsapparat gebracht und das Drehungsvermögen des Gemisches festgestellt. Jetzt liest man von Zeit zu Zeit den Drehungswinkel ab und notiert die Werte. Als Kontrollen dienen Versuche, in denen die betreffenden Immunseren unter Zusatz entsprechender Mengen physiologischer Kochsalzlösung und die Seren normaler Tiere + dem Antigen, bzw. + Kochsalzlösung auf die Änderung ihres Drehungsvermögens innerhalb derselben Versuchszeiten geprüft werden. Während in solchen eine nennenswerte Änderung des Drehungsvermögens nicht auftritt, erfolgt diese in den erstgenannten Gemischen in typischer Weise.

In den die Anaphylaxie betreffenden Versuchen von *Abderhalden* und *Pinkussohn* wurden teils je 1 cm^3 des betreffenden Immunserums + 0·5 Antigen + 5·5 physiologischer Kochsalzlösung, in anderen 0·25 Serum, 0·5 Antigen und 6·75 physiologischer Kochsalzlösung verwendet.

Der Nachweis photodynamischer Wirkungen fluoreszierender Stoffe am lebenden Warmblüter.

Von **Hermann Pfeiffer**, Graz.

Da in der jüngsten Zeit durch einschlägige Arbeiten von *W. Hausmann*[1]), *Raubitschek*[2]), *Horbaczewski*[3]) und *H. Pfeiffer*[4]) die von *Tappeiner* entdeckte photodynamische Wirkung fluoreszierender und sensibilisierender Stoffe auf Warmblüter ausgedehnt wurde und derartige Versuche auch für die menschliche Pathologie nicht bedeutungslos scheinen, sei hier im Nachtrage zu den Ausführungen *Tappeiners* in Bd. III. 2 des vorliegenden Handbuches über die Methodik beim Nachweise photodynamischer Wirkungen auf Warmblüter und die dabei in Erscheinung tretenden Erkrankungssymptome kurz berichtet.

1. Die Vorbehandlung und Belichtung der Versuchstiere.

Die Wahl des Versuchstieres. Als feines Reagens, welches außerordentlich charakteristische Krankheitserscheinungen darbietet, hat sich sowohl *W. Hausmann* als auch mir selbst die weiße Maus bewährt. Minder empfindlich ist das erwachsene Meerschweinchen, obwohl auch dieses Tier mit schweren, selbst tödlichen Erkrankungen auf die Lichtwirkungen antwortet. Es hat den Vorteil bedeutenderer Größe für sich, so daß es für spezielle Fragestellungen, wie Verhalten der Leukozyten während der Erkrankung, Studien über Harntoxizität, nicht wohl umgangen werden kann, da derartige Versuche an der weißen Maus in zureichender Weise wohl nicht gut durchführbar sind. An anderen Spezies liegen bis heute einschlägige Untersuchungen nicht vor.

[1]) *W. Hausmann*, Biochem. Zeitschr. 1909 und 1910, versch. Arbeiten.

[2]) *Raubitschek*, Zur Kenntnis der Pathogenese der Pellagra. Centralbl. f. Bakteriologie. O. 1910. Bd. 57.

[3]) *Horbaczewski*, Das österreichische Sanitätswesen. Beilage zu Nr. 31. 1910.

[4]) *H. Pfeiffer*, Über die Wirkung des Lichtes auf Eosin-Blutgemische. Wiener klin. Wochenschr. 1905. Nr. 9 und 12, pag. 211, besonders aber: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Überempfindlichkeit usw. Zeitschr. f. Immunitätsforschg. 1911 im Druck.

Man wähle zu solchen Versuchen im allgemeinen gut genährte, erwachsene Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 10—15 *g*, vermeide ihrer erhöhten Empfindlichkeit wegen schwangere Tiere. Meerschweinchen im Gewichte von 300—400 *g* sind einerseits groß genug, um genügende Blut- und Harnmengen zu liefern, andrerseits aber auch nicht zu alt, um schlecht zu reagieren. Man verwende bei subkutaner Zuführung des sensibilisierenden Stoffes möglichst Tiere, die an Bauch und Lenden weiß sind, da der Pigmentgehalt der belichteten Hautpartien abschwächend die Lichtwirkung beeinflußt.

Die Vorbereitung der Tiere. Um die Lichtwirkung intensiver zu gestalten, ist es empfehlenswert, weiße Mäuse von der Schwanzwurzel bis zum Genick mit einer krummen Schere kurz zu scheren. Dabei hält der Gehilfe das Tier mit einem Péan an der Genickhaut fest, der Experimentator mit der linken Hand den Schwanz und führt mit der rechten die Schere. Meerschweinchen werden zweckmäßig an Bauch und Lenden vom Rippenbogen bis zur Schambeinfuge rasiert.

Die Injektion wird bei Mäusen zweckmäßig subkutan unter die Rückenhaut in Versuchsmengen von 0·5—0·2 cm^3 des in 0·86$^0/_0$ Kochsalzlösung gelösten Farbstoffes vorgenommen. Dabei faßt man mit einer Pinzette die Rückenhaut nahe dem Steiß, sticht die Kanüle ein und führt sie unter steter Kontrolle des Fingers subkutan soweit als möglich bis unter die Genickhaut vor und deponiert hier die Flüssigkeit. Während des Ausziehens der Kanüle faßt man neuerdings mit der Pinzette die Einstichöffnung und hält sie, während man die Injektionsmasse, die Haut leicht knetend, gleichmäßig verteilt, fortwährend fest. Verschluß der Injektionsöffnung mit einer Michelklammer, um ein Rückströmen der Flüssigkeit zu vermeiden.

Auch beim Meerschweinchen ist die subkutante Injektion, wenn man prompte Wirkungen erzielen will, der intravenösen vorzuziehen. Man kann den Tieren bequem 5—10 cm^3 der Lösung unter die Bauchdecken einspritzen und sie nach Verschluß der Einstichöffnung durch Ligatur gleichmäßig verteilen. Eine intravenöse Vorbehandlung hat das Aufsuchen der Vena jugularis der gefesselten Tiere zur Voraussetzung. Dabei sind die Kautelen zu beobachten, die für diesen Injektionsmodus schon von *L. Michaelis* und *F. Fuhrmann* in Bd. III. 2 des vorliegenden Handbuches angegeben wurden. Außer den später zu belichtenden behandelt man immer auch eine größere Anzahl von Kontrolltieren in derselben Weise vor, die im Dunklen bleiben, sowie eine Anzahl von Tieren, die, ohne sensibilisiert worden zu sein, mit den vorbehandelten dem Lichte ausgesetzt werden.

Nach der Injektion, die außer an den zu belichtenden in derselben Weise und in denselben Versuchsmengen auch an späterhin im Dunklen zu haltenden gleich schweren Kontrolltieren in zureichender Zahl ausgeführt werden muß, warte man unter allen Umständen die unmittelbaren Folgeerscheinungen ab, indem man die Tiere in geräumigen Käfigen

oder (bei Mäusen) in Glasgefäßen im Dunklen halte. Dies gilt insbesondere von Substanzen, die man auf ihre toxische Eigenwirkung noch nicht sorgfältig ausgewertet hat. Sie kann unter Umständen (wie z. B. bei Rindergalle) eine sehr hohe sein. Treten schon im Gefolge der Sensibilisierung Krankheitserscheinungen bei den Tieren auf, muß mit einer Belichtung jedenfalls solange gewartet werden, bis die Tiere von ihrer Vergiftung sich vollständig wieder erholt haben. Benützt man, wie dies zweckmäßig ist, zum Nachweis solcher Wirkungen die Temperaturreaktion, so warte man mit der Belichtung so lange, bis die Tiere ihre Ausgangstemperatur wieder erreicht haben. Ist dies nicht der Fall, so läßt man mindestens 2 Stunden nach der Injektion die Tiere im Dunklen, damit das Sensibilisans sich gleichmäßig in der Haut verteile. Das zeigt sich bei stärker tingierenden Farbstoffen, wie z. B. bei Eosin oder bei Hämatoporphyrin darin, daß die Hautdecken die Farbe des betreffenden Körpers angenommen haben, im ersten Falle rosenrot, im letztgenannten braunrot erscheinen. Zwischen Sensibilisierung und Belichtung möge kein zu langer Zeitraum eingeschaltet werden, damit nicht eventuell durch eine Ausscheidung des Farbstoffes negative Resultate vorgetäuscht werden.

Als Injektionsflüssigkeit wählt man am besten eine Lösung oder Emulsion des Farbstoffes in 0·86% Kochsalzlösung. Man hüte sich vor stark alkalischen, insbesondere aber vor einer sauren Reaktion, weil dadurch die Versuchstiere an sich schwer geschädigt werden. Um das sensibilisierende Vermögen eines Körpers zu bestimmen, tut man gut daran, zunächst seine Dosis toxica tolerata bei verschiedener Konzentration festzustellen und darunter dann jene zu wählen, welche den Stoff in größter Menge enthält. Hat sich unter steter Berücksichtigung der Resultate mit unbelichteten Kontrollen eine photodynamische Wirkung feststellen lassen, so geht man in neuen Versuchen mit der Injektionsdosis herab und versuche, ob nicht doch an sich unschädliche Mengen sensibilisierend wirken.

Von den bisher untersuchten Farbstoffen steht hinsichtlich seines sensibilisierenden Vermögens sowohl als auch hinsichtlich seiner fast völlig fehlenden toxischen Eigenschaft auf Mäuse und Meerschweinchen das reine krystallisierte Hämatoporphyrin in alkalischer Lösung an erster Stelle. Noch mit Mengen von 0·0001 *g* kann man bei 12 Stunden später vorgenommener Belichtung die weiße Maus nach einem zweistündigen Aufenthalt im Bogenlichte sicher töten, im Sonnenlicht mit noch kleineren Mengen. Auch wasserlösliches Eosin hat sich mir als recht wirksam erwiesen; mit 0·005 *g* des Farbstoffes konnte noch gut sensibilisiert werden. *O. Raab*[1]) erhielt mit 0·2—0·45 Eosin pro Kilogramm, *A. Jodlbauer* und *B. Busk*[1]) mit 0·2—0·4 Eosin, 0·1=0·2 Erythrosin chronische Effekte.

Soll, wie das insbesondere von *Raubitschek* und *Horbaczewski* geschehen ist, durch Fütterung, z. B. mit Polenta oder, wie in den Ver-

[1], [1]) Zitiert nach *Jodlbauer* u. *Busk*, Archiv. de pharmac. et de thérapie. 15. p. 269.

suchen *Hausmanns*, mit Buchweizen sensibilisiert werden, so muß das veränderte Nahrungsregime längere Zeit hindurch eingehalten werden, bis photodynamische Wirkungen im Lichte zur Beobachtung kommen. Mäuse vertragen im allgemeinen die veränderte Nahrung selbst durch viele Monate hindurch vorzüglich. Meerschweinchen sah ich wiederholt bei ausschließlicher Polentanahrung nach 1—2 Monaten unter hochgradiger Kachexie im Dunklen zugrunde gehen.

Die Belichtung kann man im Bogenlichte, besser noch, aber bei der weißen Maus nur unter Einhaltung bestimmter Kautelen, auch im Sonnenlichte vornehmen.

Benützt man eine Bogenlampe als Lichtquelle, so empfiehlt sich eine 30—40 Ampère-Lampe, wie sie den Projektionsapparaten beigegeben ist. In einer Entfernung von 80—100 *cm* von der Lichtquelle werden die Versuchsmäuse — vorbehandelte und unvorbehandelte — in geräumigen Glasgefäßen, deren Boden mit einer dünnen Schichte Torfmull bedeckt und mit einem dünnen Drahtgeflecht verschlossen ist, ausgesetzt. Um schädliche Wärmewirkungen auszuschalten, muß das Licht in entsprechender und ausgiebiger Weise unter steter Wasserkühlung gehalten werden. Will man seine Wirkung noch intensiver gestalten, so kann man es ohne Schaden leicht konvergent machen und in diesen Strahlenkegel die Tiere einbringen. Die Zeitdauer der Belichtung, die natürlich von der Stärke der Lichtquelle abhängt, ist darnach verschieden. Für stärker sensibilisierende Stoffe können schon nach 1, sicher aber nach 2 Stunden tödliche Reaktionen erzielt werden, während die Kontrollen dadurch keinen Schaden erleiden.

Ähnlich verfährt man bei der Verwendung von Sonnenlicht, muß aber dabei äußerst vorsichtig sein und die Resultate immer mit unvorbehandelten normalen Mäusen kontrollieren, da bei zu langer Einwirkung auch diese dadurch schwer geschädigt werden können, ja sogar im direkten Sonnenlichte leicht eingehen. Im allgemeinen aber können durch einstündige Bestrahlung einerseits starke photodynamische Wirkungen erzielt werden, andrerseits schaden solche unvorbehandelten Tieren nicht. Es ist aus später zu erörternden Gründen am besten, alle 15—20 Minuten die Körpertemperatur der Tiere festzustellen. Zeigt sich ein Abfall der sensibilisierten schon im Lichte, so kann man sicher sein, starke Reaktionen ausgelöst zu haben. Die normalen Kontrollen sollen während der Belichtung nicht mehr als höchsten 10° Körpertemperatur aufweisen. Meist kann man aber den Versuch viel früher abbrechen, bevor eine Schädigung der normalen Tiere eingetreten ist.

Stark sensibilisierende fluoreszierende Stoffe, z. B. das Hämatoporphyrin, vermögen die Mäuse akut auch bei längerem Aufenthalte im diffusen Tageslichte zu schädigen. Es ist selbstverständlich eine längere Belichtungszeit notwendig, welche von den Kontrollen anstandslos vertragen wird. Bei Beobachtung auf chronisch eintretende photodynamische Effekte (lokale Nekrosen, Ekzeme usw.) müssen die Tiere oft tage- und wochenlang im diffusen Tageslichte verweilen. Dabei muß für möglichst gleichmäßige

Temperatur im Beobachtungsraume und für Reinheit der Versuchsgläser sowie für zureichende und entsprechende Nahrung gesorgt, die Kontrollen müssen unter dieselben Versuchsbedingungen gesetzt werden.

Meerschweinchen belichtet man entweder gefesselt auf dem Spannbrette oder aber in einem nicht zu weiten Glaszylinder, in dem sie gezwungen sind, aufrecht zu stehen und so ihren enthaarten Bauch dem Lichte zuzuwenden. Verwendet man das Spannbrett, so ist es zweckmäßig, außer der allgemeinen Wasserkühlung des Lichtes auf den Bauch der Tiere noch eine zirka 2 *cm* dicke Kühlkammer direkt aufzulegen. Hier kann man sich auch durch eine Berieselung des Bauches der Tiere helfen. Im Sonnenlichte sind bei diesen Spezies besondere Kautelen im Vergleiche zum Bogenlichte nicht notwendig. Man beachte aber bei Verwendung des Spannbrettes, daß schon normalerweise durch die Fesselung die Tiere einen nicht unbeträchtlichen Shock durchmachen, der sich in Mattigkeit und einer starken Temperaturerniedrigung zu erkennen gibt, die allerdings rasch nach der Befreiung überwunden, bei nicht sensibilisierten Meerschweinchen rasch wieder zur Norm zurückkehrt. Aus diesem Grunde hat der Verfasser in letzter Zeit die Belichtung im Glasgefäß vorgezogen. Während man selbstredend im Sonnenlichte sensibilisierte Tiere und die unvorbehandelten Kontrollen gleichzeitig aussetzen kann, ist dies beim Bogenlichte nicht möglich. Die Tiere müssen dann nacheinander belichtet werden.

2. Die Krankheitserscheinungen.[1])

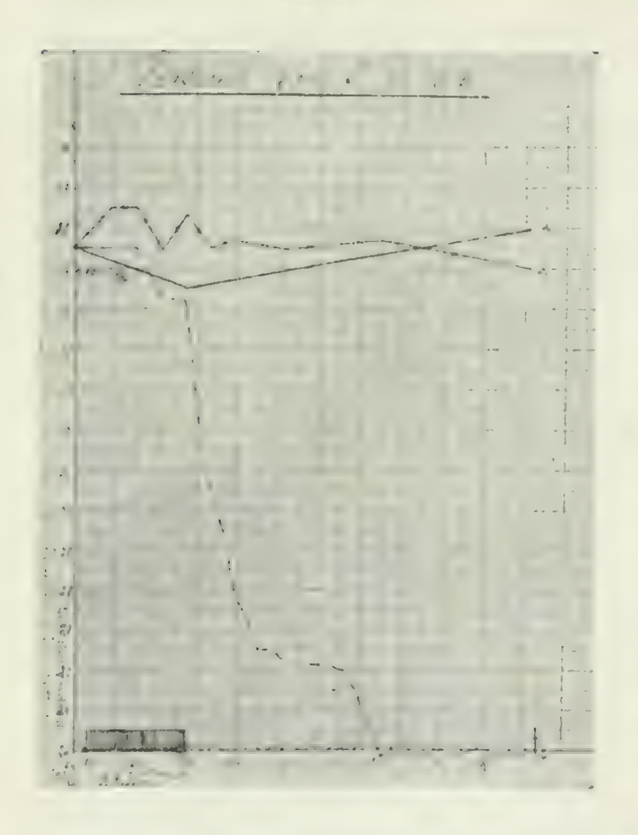
a) Die akute Erkrankung der weißen Maus. Das Erkrankungsbild deckt sich absolut mit jenem der Mäuseurämie. Mit Erfolg sensibilisierte Mäuse zeigen im Lichte und das im Gegensatze zu den unvorbehandelten und belichteten Kontrollen, sofort das von *W. Hausmann* beschriebene Juckphänomen, indem sie sich heftig die Schnautze, Körper und Schwanz ohne Unterlaß kratzen und putzen. Bald stellt sich eine auffallende Lichtscheu und ein Aufregungszustand ein, so daß die Tiere sich hinter den normalen Kontrollen zu verkriechen und so dem Lichte auszuweichen versuchen. Charakteristisch ist auch die bald folgende ödematöse Anschwellung von Kopf und Ohren und Tränenfluß. Bei größeren sensibilisierenden Dosen (0·001 Hämatoporphyrin in 1% ganz schwach alkalischen Lösungen) werden die Tiere in kurzer Zeit im Lichte matt und somnolent und gehen noch während der Belichtung zugrunde, nachdem manchmal auch hier ein ganz kurz ausgeprägtes Stadium der Reflexerregbarkeit (Fußklonus, Anfälle tetanischer Starre, rauschähnliche Zustandsbilder) nachweisbar waren. Die normalen belichteten, sowie die sensibilisierten unbelichteten Tiere bleiben völlig gesund.

Wird die sensibilisierende Dosis kleiner gewählt, so ist der ganze Krankheitsverlauf ein protrahierterer und charakteristischer. Die Tiere

[1]) Dabei ist insbesondere die Sensibilisierung mit Hämatoporphyrin und Eosin in Betracht gezogen.

überstehen die zweistündige Bestrahlung unter lebhaftem Juckreiz und verfallen erst, wenn sie aus dem Lichte gebracht werden. In wenigen Minuten oder in einer halben Stunde stellt sich Mattigkeit, später Somnolenz ein. Bei Progredienz der Erscheinungen kann man nunmehr bald durch Kneifen in das Hinterbein klonische Zuckungen des ganzen Tierkörpers auslösen, ein Ausdruck gesteigerter Reflexerregbarkeit, der bald in Anfälle von tetanischer Starre hinüberleitet. Sie bestehen darin, daß die Mäuse bei sistierter Atmung, krampfhaft ausgestreckten Extremitäten und gebeugtem Rücken wie tot daliegen. Dieser Tetanus, der bis zu mehreren Minuten dauern und sich durch viele Stunden immer wiederholen kann, währt mehrere Sekunden bis einige Minuten. Dann kommt die Atmung wieder in Gang, die Starre erschlafft, bis ein neuer Anfall die Tiere befällt. Noch später überkommt die Tiere ein ganz eigentümliches, rauschähnliches Zustandsbild, in dem sie wie betrunken herumtaumeln, bald aber wieder in Tetanus verfallen und endlich nach stundenlanger Agone unter Erlöschen der Reflexe zugrunde gehen. Während der ganzen Erkrankung besteht eine auffallende Polyurie, häufig werden breiige bis flüssige Faezes entleert.

Fig. 141.

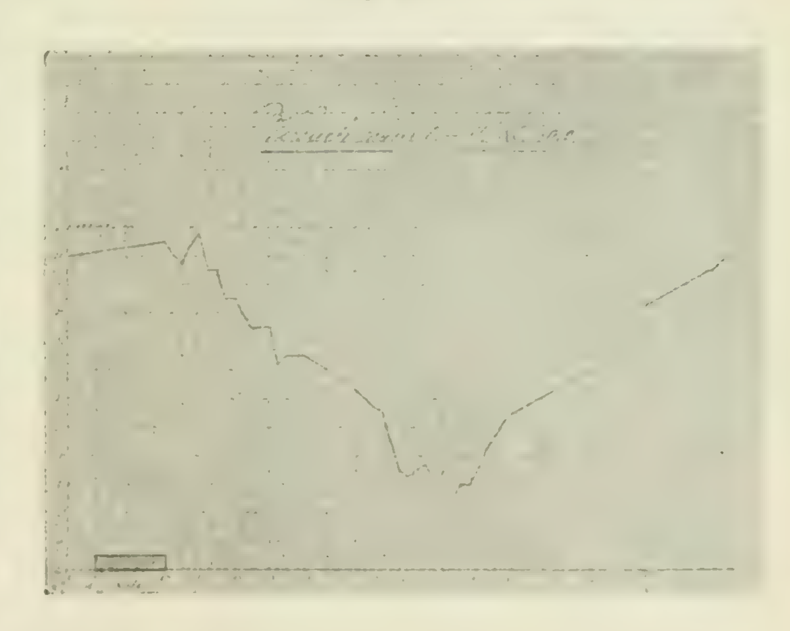


Interessant ist das **Verhalten der Körpertemperatur**, welche wohl den feinsten Ausdruck photodynamischer Schädigungen darstellt (photodynamischer Temperatursturz, *H. Pfeiffer*). Registriert man die Körperwärme solcher Tiere vom Momente der Belichtung an, so wird man bei mittleren und kleineren Dosen, während die Mäuse noch in jenem Zustande von Aufregung sich befinden, häufig einen leichten Anstieg über die Norm wahrnehmen. Als Vorläufer der Mattigkeit aber, und mit ihr immer zunehmend, setzt ein Temperaturabfall ein, welcher, den Krankheitserscheinungen absolut parallel gehend, intra vitam zu Temperaturen von 24—20° C führen kann. Daß es sich dabei nicht um agonale Erscheinungen, sondern um ein wesentliches Erkrankungssymptom handelt, ergibt sich aus den beigegebenen Kurven, von denen die erste (Fig. 141) die Körpertemperatur eines letal, die andere eines subletal geschädigten Versuchstieres nebst den Kontrollen wiedergibt. Es zeigt sich in dem ersten Falle, daß schon stundenlang vor Eintritt der Agone als erstes Anzeichen der Schädigung der rapide Absturz der Körpertemperatur einsetzt und zu seinem Minimum ge-

führt hat. Das subletal im Lichte geschädigte Tier (vgl. Fig. 142) zeigt mit Zunahme der Krankheitserscheinungen wieder jenen Temperatursturz bis zu 27·5° C, während mit Beginn der Wiedererholung die Temperatur allmählich wieder zur Norm ansteigt, später einem oft tagelang anhaltenden Fieber Platz macht. Dabei bleibt, wie die Kontrollen der Kurven lehren, die Körpertemperatur der belichteten unvorbehandelten und der sensibilisierten unbelichteten Kontrollen normal.

Der Obduktionsbefund solcher im Lichte akut zugrunde gegangener Tiere charakterisiert sich häufig nur in einer hochgradigen Hyperämie der Bauchorgane. Bei etwas protrahierterem Verlauf aber finden sich nicht selten die Erscheinungen einer akuten, meist hämorrhagischen Gastroenteritis, mittlere bis schwere fettige Degeneration insbesondere der Nieren, aber auch der Leber und des Herzens. Auffallend ist auch die bis zum Platzen prall mit Galle gefüllte Gallenblase.

Fig. 142.

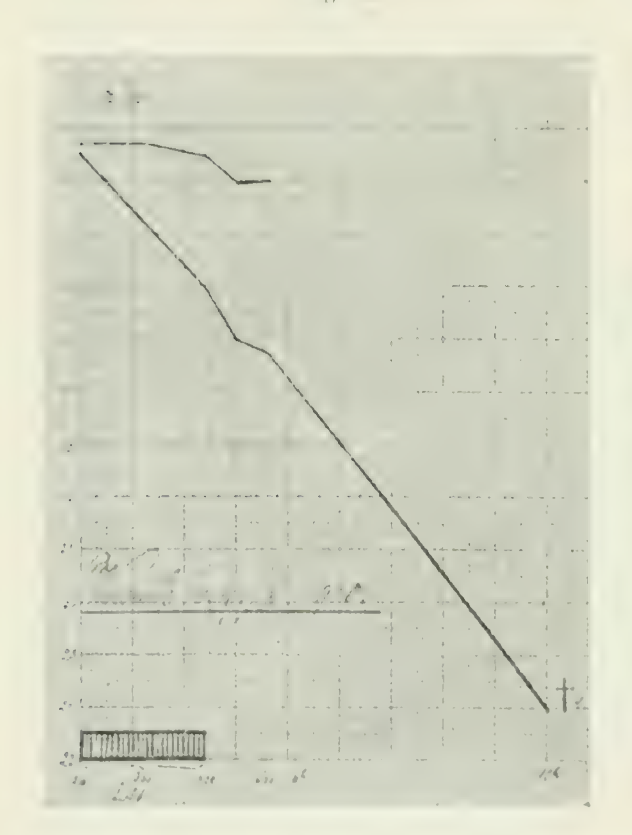


b) Der chronische Erkrankungsverlauf der weißen Maus. Er ist die mildeste Form der photodynamischen Schädigung. Nach einem mehr minder ausgesprochenen akuten Vorstadium, welches, wie oben geschildert, in Erholung ausgeht, aber auch ohne jede schwerere allgemeine Krankheitserscheinung, erkranken die Tiere insbesondere im diffusen Tageslichte nach Tagen bis Wochen unter Tränenfluß, der bald zu einer ausgesprochenen Konjunktivitis überführt, kenntlich an den durch Sekret verklebten Augen. Auch hier sind intensive Ödeme, insbesondere wieder am Kopf und Genick, aber auch am übrigen Körper wahrzunehmen. Der Pelz der Tiere wird schäbig. Es entwickelt sich ein nässendes, oft einen Großteil der Körperoberfläche einnehmendes Ekzem oder ausgebreitete Hautnekrosen. Besonders auffallend ist dabei eine Gangrän, welche die Ohrmuscheln ergreift und zu einer Abstoßung dieser Körperteile führen kann. Die Tiere gehen schließlich kachektisch zugrunde, oder erholen sich, ins Dunkel gebracht, vollständig.

c) Die photodynamische Schädigung des Meerschweinchens *(H. Pfeiffer).* Im Lichte zeigen ältere Tiere außer einer hochgradigen Aufregung, Lichtscheu, Juckreiz und Polyurie meist keine schweren Krankheitserscheinungen. Werden die Tiere aber aus der Lichtquelle entfernt, so beginnt — eine Schädigung von genügender Intensität vorausgesetzt

sich rasch ein außerordentlich charakteristischer Symptomenkomplex zu entwickeln. In seinem Zentrum steht wieder ein initialer, enorme Grade erreichender Temperatursturz, der bei tödlichem Ausgange 10—16° unter die Norm betragen kann. Dabei wird das Tier zunächst matt, sein Fell sträubt sich in eigentümlicher Weise, die Hinterbeine sind paretisch. Später schauert das Tier alle paar Minuten zusammen, zeigt konische Zuckungen der Körpermuskulatur, wird später somnolent, und geht schließlich in einer lange hingestreckten Agone oft unter Erscheinungen einer profusen Diarrhöe zugrunde. Die Kontrolltiere bleiben völlig intakt. (Vgl. Fig. 143.)

Fig. 143.



Verfolgt man durch Blutentnahme (am besten hinter den Ohren und aus der Genickgegend) die Leukozytenzahl solcher Tiere, so beobachtet man unmittelbar nach der Entfernung aus dem Lichte eine, oft sehr intensive polynucleäre Leukocytose, die dann mit Progredienz der Erscheinungen rasch in eine Leukopenie übergeht. Die peripheren Gefäße werden dabei sehr häufig fast völlig blutleer angetroffen, so daß oft kaum aus der Vena jugularis genügende Mengen von Blut gewonnen werden können. Tritt der Tod nicht akut ein, so können sich die Tiere unter Anstieg ihrer Körpertemperatur allmählich erholen. In den nächsten Tagen besteht meist hohes Fieber fort und es entwickeln sich nun an der Belichtungsstelle charakteristische Veränderungen. Während nicht belichtete Tiere die Farbstoffe (Eosin und Hämatoporphyrin) reaktionslos resorbieren, entwickelt sich bei belichteten zunächst ein teigiges Ödem, welches nach 2 Tagen in ein derbes Infiltrat sich umgewandelt hat. Dieses beginnt nach 48 weiteren Stunden mit der lebhaft entzündeten Haut nekrotisch zu werden, vertrocknet zu einem rotbraunen, lederartigen Schorf, der sich von den unbelichteten Hautpartien zu demarkieren beginnt; er stößt sich im weiteren Verlaufe von den unbelichteten und gesund gebliebenen Hautpartien ab. Das nunmehr zurückbleibende tiefgreifende Geschwür verheilt glatt im Verlaufe von Wochen. Manchmal kann auch Spättod unter hochgradiger Kachexie zur Beobachtung kommen. Ebenso wie bei der Maus, kann auch beim Meerschweinchen (vgl. dazu die Erfahrungen *Lodes*[1]) an mit Polenta

[1]) *Lode*, Vortrag, wissenschaftl. Ärztegesellschaft in Innsbruck. Referat in Wiener klin. Wochenschr. 1910. Nr. 31. p. 1160.

gefütterten Meerschweinchen) jegliche akute Erkrankung vermißt werden. Die photodynamischen Wirkungen geben sich dann noch in Haarausfall und in dem Auftreten juckender Ekzeme zu erkennen.

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen bestehen bei akutem Krankheitsverlauf in hochgradiger Hyperämie der Bauchorgane und vagen Degenerationserscheinungen, insbesondere der Nieren. Tritt der Tod etwas später ein, so sind außerdem meist ekchymotische Blutungen in der Magen- und Darmschleimhaut (seltener der Lungen) neben mehr minder schweren Erscheinungen einer Gastroenteritis, außerdem leichte bis schwere fettige Degenerationen von Nieren, Leber und Herz anzutreffen. Das Blut bleibt im Kadaver lange Zeit ungeronnen.

Hinsichtlich der Bestimmung der Harntoxizität solcher Tiere unter dem Einfluß photodynamischer Wirkungen gelten dieselben Grundsätze, wie ich sie in diesem Handbuche für die Harnuntersuchungen während des anaphylaktischen Shocks aufgestellt habe.

Über Mikropolarisation.[1]

Von **Emil Fischer**, Berlin.

Zur Bereitung der Lösung dient das nebenstehend (Fig. 144) in natürlicher Größe abgebildete Glasgefäß mit sorgfältig eingeriebenem Stöpsel. In ihm wird die Substanz und das Lösungsmittel abgewogen und dann die Lösung am besten durch Umschütteln hergestellt. Da eine geringe Menge Flüssigkeit sich zwischen Glaswand und Stöpsel setzen kann, so ist es nötig, diesen zum Schluß zu lüften, wieder aufzusetzen und nochmals zu schütteln. Um das Mischgefäß bequem wägen zu können, wird es in einen kleinen gläsernen Zylinder eingestellt.

Fig. 144.



Das Pyknometer hat die gewöhnliche Form (Fig. 145) und ist so dickwandig, daß es nur 0·07 cm^3 faßt. Das Polarisationsrohr von 5 *cm* Länge hat einen inneren Durchmesser von 1·5 *mm* und faßt nicht mehr als 0·1 cm^3. Es besteht aus weißem Glas, ist aber ganz mit Hartkautschuk bekleidet. Für genauere Messungen verwendet man ein ebenso konstruiertes Rohr von 10 *cm* Länge, dessen Inhalt dann aber 0·2 cm^3 beträgt. Die Überführung der Flüssigkeit aus dem Mischgefäß in das Polarisationsrohr oder Pyknometer geschieht mit einem engen Glasrohr, das zu einer Kapillaren ausgezogen ist. Letztere muß so lang sein, daß sie bis auf den Boden des Polarisationsrohrs reicht, dessen Füllung dann keine Schwierigkeiten bietet. Auf dieselbe Weise kann man die Flüssigkeit wieder aus dem Polarisationsrohr entnehmen und in das Pyknometer einführen. Die Wägung muß selbstverständlich mit einem empfindlichen Instrument ausgeführt werden. Es genügt aber dafür eine gewöhnliche zweiarmige Wage, welche bei einer Maximalbelastung von 10 *g* noch 0·05 *mg* zuverlässig angibt.

Fig. 145.

Die Abblendung des polarisierten Lichtes wird am besten der inneren Weite des Polarisationsrohres angepaßt. Die Ablesungen sind bei Anwen-

[1]) *E. Fischer*, Synthese von Polypeptischen. Sitzungsber. der Berliner Akademie. **1908**, 552; vgl. Chem. Zentralbl. **1908**. II. 315. Ferner: Über Mikropolarisation. Ber. d. deutsch. chem. Gesell. **44**. 129 (1911).

dung von Gasglühlicht sehr leicht auszuführen. Natriumlicht, das auf die gewöhnliche Weise durch Verdampfen von Chlornatrium oder Bromnatrium in der *Bunsen*-Flamme erzeugt wird, ist allerdings zu schwach, um scharfe Ablesungen zu gestatten. Vorzügliche Dienste leistet dagegen der Polarisationsapparat der Firma *Schmidt* & *Haensch* in Berlin, bei dem homogenes Licht durch Spektralzerlegung von *Nernst*-Licht hergestellt wird. Die Ablesungen werden mit diesem Apparat bei passender Blendvorrichtung auch im 10 *cm*-Rohr noch so scharf, daß der mittlere Fehler nur 0·02° beträgt.

Die Leistungsfähigkeit der Methode ergibt sich aus folgenden Bestimmungen mit Rohrzucker, für den $[\alpha]_D^{20°} = +66·65°$ in 10%iger Lösung und $+66·73°$ in 5%iger wässeriger Lösung beträgt.[1] Alle Bestimmungen sind bei 20° und mit D-Licht ausgeführt.

Der durch Ungenauigkeit der Wägung entstehende Fehler könnte durch die Benutzung feinerer Wagen noch erheblich herabgesetzt werden. Aber in der jetzigen Form ist die Methode schon für die allermeisten Fälle ausreichend, wenn es sich darum handelt, mit 5—10 *mg* Substanz eine orientierende polarimetrische Bestimmung auszuführen.

Substanz	Gewicht der Lösung	Spez. Gewicht	Drehung	Rohrlänge *cm*	$[\alpha]_D^{20°}$
0·02140	0·21160	1·043	3·49°	5	66·2
0·02230	0·24115	1·034	3·18°	5	66·5
0·02020	0·20705	1·037	3·38°	5	66·8
0·02000	0·20185	1·041	3·42°	5	66·3
0·01043	0·21218	1·017	1·67°	5	66·8
0·01015	0·21218	1·018	1·63°	5	66·9
0·01140	0·20882	1·019	1·88°	5	67·6
0·00970	0·18405	1·018	1·80°	5	67·1
0·00575	0·12930	1·018	1·52°	5	67·2
0·01280	0·25790	1·016	3·39°	10	67·2

Die Polarisationsröhren noch mehr zu verengen, ist aus folgenden Gründen nicht zweckmäßig: Erstens wird dann die Einfüllung mit dem kapillaren Glasrohr zu schwierig und zweitens gestattet die jetzige Weite des Rohres noch die Klärung schwach getrübter Flüssigkeiten durch Sedimentierung. Es ist nämlich bei präparativen Arbeiten mit sehr kleinen Mengen öfters unmöglich, ganz klare Lösungen herzustellen. Rührt die Trübung von Substanzen her, die nicht allzu leicht sind, so klären sie sich beim ruhigen Liegen im Polarisationsrohr. Bei der oben angegebenen Weite des Polarisationsrohres tritt diese Klärung tatsächlich noch in vielen Fällen ein.

Wenn statt Wasser andere Lösungsmittel zur Anwendung kommen, ist es ratsam, die leicht flüchtigen Flüssigkeiten zu vermeiden, da bei der

[1] *Tollens*, Ber. d. deutsch. chem. Gesell. Bd. **10**, 1410 (1877).

geringen Menge der Lösung durch Verdunstung beim Umfüllen ziemlich große Fehler entstehen können.

Gleichzeitig mit *E. Fischer* hat sich *J. Donau* [1]) im Laboratorium von *F. Emich* in Graz damit beschäftigt, Kapillarröhren für polarimetrische Beobachtungen zu verwenden: *Donau* benutzt Kapillarröhren aus schwarzem Glas, die noch erheblich enger sind, als die zuvor erwähnten, dafür allerdings auch kaum mehr die Klärung von trüben Flüssigkeiten gestatten werden. *Donau* hat sich damit begnügt, die Verwendbarkeit solcher Kapillaren für polarimetrische Zwecke gezeigt zu haben, ohne die Herstellung von Lösungen und die Bestimmung des spezifischen Gewichtes in demselben kleinen Maßstabe durchzuführen.

In dieser Kombination liegt aber der Hauptvorteil der Methode, die in den letzten Jahren so häufig polarimetrische Bestimmungen gestattet hat, wo man früher auf solche Beobachtungen wegen Mangel an Material verzichten mußte.

Die Firma *Schmidt & Haensch* in Berlin liefert zu ihren Polarisationsapparaten auch die engen Röhren, sowie die beiden, oben erwähnten Glasgefäße. Letztere können übrigens auch von jedem geschickten Glasbläser angefertigt werden.

---

[1]) *Julius Donau*, Polarimetrische Versuche mit kleinen Flüssigkeitsmengen. Monatsh. f. Chemie. **29**. 333 (1908); vgl. Chem. Zentralbl. **1908**, II. 475.

Die optische Methode und ihre Verwendung bei biologischen Fragestellungen.

Von **Emil Abderhalden**, Berlin.

Mit dem Namen „optische Methode“ hat der Verfasser die Verfolgung biologischer Vorgänge mit Hilfe des Polarisationsapparates bezeichnet. Die Feststellung des Abbaus bestimmter Substrate durch Fermente durch fortlaufende Beobachtung des Drehungsvermögens des Ferment-Substratgemisches ist wiederholt mit großem Erfolg durchgeführt worden. Für diese bekannte Methode war eine besondere Bezeichnung nicht nötig. Wir haben es hier meistens mit ganz klaren Verhältnissen zu tun. Die Bezeichnung „optische Methode“ ist für Vorgänge gebraucht worden, bei denen wir Drehungsänderungen feststellen können, ohne daß wir a priori imstande sind, etwas über den Vorgang auszusagen, welcher der Veränderung des optischen Verhaltens zugrunde liegt. Die optische Methode kann in dieser Form uns bestimmte Vorgänge, die unserer Beobachtung zunächst nicht zugänglich sind, zur Wahrnehmung bringen. Mit anderen Methoden ist dann der Nachweis zu führen, welcher Art der Vorgang ist.

Ein Beispiel möge zeigen, in welcher Art die Anwendungsweise der optischen Methode gedacht ist. Systematische Untersuchungen hatten ergeben, daß das Plasma resp. Serum von normalen Hunden seine Anfangsdrehung bei 37° beibehält. Veränderungen beobachtet man nur bei kranken Tieren und speziell bei Infektionskrankheiten und bei diesen vor allem bei hohem Fieber. Ob ein regelmäßiger Befund bei den erkrankten Tieren vorliegt, läßt sich zur Zeit nicht entscheiden. Das untersuchte Material ist ein zu geringes. Feststehend ist dagegen der Befund, daß Plasma resp. Serum normaler Hunde seine Anfangsdrehung beibehält. Fügt man zu solcher Blutflüssigkeit einen Eiweißkörper, z. B. Eiereiweiß oder aus Proteinen gewonnene Peptone, dann bleibt unter normalen Verhältnissen das Drehungsvermögen des Gemisches unverändert. Durch mehrere Jahre systematisch durchgeführte Versuche hatten ergeben, daß die Formelemente des Blutes reich an Fermenten sind. Diese Beobachtung führte zu der Forderung, daß das zu derartigen Versuchen verwendete Plasma resp. Serum

unter allen Umständen frei von aus den Zellelementen stammenden Produkten sein muß.

Zu ganz anderen Resultaten kommt man, wenn Plasma resp. Serum von Hunden verwendet wird, denen vorher subkutan, intraperitoneal oder intravenös Proteine oder Peptone eingeführt worden sind. Nunmehr beobachtet man, daß das Plasma resp. Serum plus zugesetztem Eiweiß resp. Pepton die Anfangsdrehung beständig ändert. Ein bestimmter Schluß über die Art des Vorganges kann aus diesem Befund nicht gezogen werden. Erst der Nachweis, daß Serum derart vorbehandelter Tiere mit Eiweiß zusammengebracht, Peptonbildung erkennen läßt (Dialysierversuch), läßt den Schluß zu, daß der Drehungsänderung ein Abbau von Eiweiß, durch Fermente zugrunde liegt. Die parenterale Zufuhr von körperfremden Eiweißstoffen resp. Peptonen, bewirkt das Auftreten, oder allgemeiner ausgedrückt, das Wirksamwerden von proteolytischen Fermenten im Plasma. Nachdem nun festgestellt ist, daß der beobachteten Drehungsänderung eine Fermentwirkung zugrunde liegt, ist es nicht mehr nötig, von einem optischen Verhalten des Plasmas unter den genannten Bedingungen zu sprechen, wir sind jetzt vielmehr berechtigt, das Auftreten von Fermenten und den dadurch bedingten Abbau bestimmter Substrate als Ursache der Veränderung der Anfangsdrehung anzugeben. Die „optische Methode" ermöglichte das Auffinden dieses biologischen Vorganges, dieser interessanten Reaktion des Organismus auf die Zufuhr körperfremder Stoffe. Sie allein vermochte jedoch den Prozeß, der der Drehungsänderung zugrunde liegt, nicht aufzuklären.

Genau die gleichen Bemerkungen gelten für die Feststellung einer Drehungsänderung eines Plasmarohrzuckergemisches. Wurde Plasma von Hunden verwendet, denen Rohrzucker parenteral zugeführt worden war, dann trat eine sehr deutliche Änderung der Anfangsdrehung auf. Plasma von normalen Hunden zeigte keine Veränderung des optischen Verhaltens. Hier war aus der ganzen Art der Drehungsänderung der Schluß gegeben, daß das Plasma von Hunden, denen Rohrzucker parenteral zugeführt worden war, Invertin enthält. Zwingend wurde diese Schlußfolgerung jedoch erst durch den direkten Beweis einer Zerlegung des zugesetzten Rohrzuckers in Dextrose und Laevulose mit Hilfe chemischer Methoden.

Die optische Methode wird ohne Zweifel noch viele analoge Vorgänge aufdecken. Haben wir doch sicher bei den verschiedensten Infektionskrankheiten eine Zufuhr artfremder Bestandteile! Sollte der Organismus nicht auch hier Fermente mobil machen, um all diesen Bestandteilen ihre spezifische Struktur zur nehmen? Vielleicht sind hier Fermente vorhanden, die auf die Bausteine der Bakterienleiber spezifisch eingestellt sind. Als Substrate waren in all diesen Fällen Produkte aus den entsprechenden Mikroorganismen anzuwenden. So wurde beispielsweise versucht, aus Rotzbazillen durch partielle Hydrolyse Produkte zu gewinnen, die dazu dienen sollten, im Plasma rotzkranker Tiere spezifische

Fermente aufzufinden. Ferner wurde Tuberkeleiweiß peptonisiert und beobachtet, ob Plasma von tuberkulosen Tieren mit solchem Pepton eine Änderung der Anfangsdrehung ergibt. Die Beobachtungen waren durchwegs ermunternd.

Von der gleichen Grundlage ausgehend ist auch geprüft worden, ob im Plasma Schwangerer Fermente vorhanden sind, die Chorionzottenbestandteile abbauen. Als Substrat zu diesen Versuchen diente Pepton, das aus Plazenta gewonnen war. Im Zusammenhang mit diesen Studien konnte auch ein Einblick in das Verhalten des Plasmas während der Eklampsie gewonnen werden.

Die Anwendungsmöglichkeit der optischen Methode als Pfadfinderin ist mit den genannten Beispielen noch keineswegs erschöpft. Es sei nur daran erinnert, daß die optische Methode sich auch bei Anaphylaxiestudien bewährt hat. Ferner dürfte auch eine systematische Verfolgung der Präzipitinbildung neue Einblicke in dieses interessante Phänomen bringen. Klinisch sind unzählige Fragestellungen angreifbar. Schon die Feststellung des Drehungsvermögens des Plasmas unter verschiedenartigen Verhältnissen muß zu bestimmten Resultaten führen. Verfasser denkt hier an die verschiedenartigsten Infektionskrankheiten, an Stoffwechselstörungen, speziell an Diabetes etc., ferner an Asthma, an Epilepsie usw. In keinem Falle ist zu erwarten, daß die optische Methode auf bestimmte Fragestellungen ohne weiteres eine bestimmte Antwort gibt. Sie wird einzig und allein auf bestimmte Eigentümlichkeiten aufmerksam machen können. Es wäre z. B. denkbar, daß bei bestimmten Fällen von Diabetes ein auffallend hohes Drehungsvermögen des Plasmas vorhanden ist, das nach einer bestimmten Art der Ernährung sich in ganz typischer Weise ändert. Das Drehungsvermögen des Plasmas läßt sich mit wenig Blut in ganz kurzer Zeit feststellen. Ergibt ein großes Material die gleichen Resultate, dann ist der Boden gegeben zu exakteren, mit anderen Methoden in Angriff zu nehmenden Fragestellungen. Schon eine große Reihe von Beobachtungen des Drehungsvermögens des Plasmas bei verschiedenen Fällen von Diabetes, bei mannigfaltigen Infektionskrankheiten, z. B. bei der Pneumonie etc., dürfte Anhaltspunkte zu neuen Fragen geben. Für die einzelne Untersuchung genügen 5—10 cm^3 Blut. Es wird am besten direkt in das mit Ammonoxalat beschickte Zentrifugierröhrchen einlaufen gelassen. Nun schüttelt man ca. 5 Minuten und zentrifugiert. Das Plasma füllt man in ein $^1/_4$ *dm*-Polarisationsrohr und liest ab. Der ganze Versuch nimmt höchstens 10—15 Minuten in Anspruch. Das Plasma kann dann noch zu anderen Versuchen Verwendung finden. In vielen Fällen lohnt es sich, das Drehungsvermögen des Plasmas ohne weiteren Zusatz wiederholt während mehrerer Stunden abzulesen. Auch Beobachtungen nach Zusatz von Peptonen etc. sind von Interesse. Verfasser hat bis jetzt nach dieser Richtung die Pneumonie und den Rotz eingehender studiert. Es wäre sehr erwünscht, wenn in klinischen Laboratorien die optischen Methoden häufiger verwendet würde.

Aus der Fülle von Fragestellungen, die sich ohne weiteres aus den bis jetzt erhobenen Befunden ergeben, seien noch folgende erwähnt. Der normale Organismus reagiert auf die Zufuhr artfremder Stoffe mit der Mobilmachung von Fermenten. Wie verhält sich der kranke Organismus? Finden wir auch beim Diabetiker nach parenteraler Rohrzuckerzufuhr Invertin im Blute?

Weiterhin gibt uns die optische Methode die Möglichkeit in die Hand, nicht nur den Verlauf von Infektionskrankheiten zu verfolgen, sondern wir sind auch in der Lage, das Verhalten des Organismus nach Zufuhr von Antiseris zu studieren.

Endlich ist die Möglichkeit gegeben, bei Verwendung bekannter Substrate das W a c h s t u m v o n M i k r o o r g a n i s m e n optisch zu differenzieren. Die verschiedenen Lebewesen greifen ein bestimmtes Substrat an verschiedenen Stellen an. Die Folge ist, daß verschiedenartige Bruchstücke entstehen. Unsere Methoden reichen noch nicht aus, um diese selbst zu identifizieren. Vorläufig müssen wir die fortlaufende Verfolgung der Veränderung des Drehungsvermögens während des Wachstums der Mikroorganismen als Erkennungsmittel eines spezifischen Abbaus zu Hilfe nehmen.

Die gegebenen Beispiele lassen ohne weiters erkennen, daß die optische Methode dazu berufen ist, noch nach vielen Richtungen als Pfadfinderin zu dienen. Es sind bis jetzt nur ganz wenige Probleme durchgearbeitet. Es bedarf noch vieler Erfahrungen, um ihre Anwendung zu einer allgemeinen zu gestalten. Die wesentlichste Schwierigkeit beim Fahnden auf Fermente ergibt sich bei der Wahl des Substrates. Genuine Proteine sind in den meisten Fällen nicht zur Stelle. Wo es immer geht, sollte man von diesen ausgehen. Man könnte daran denken, bei der Prüfung auf Fermente, die auf Mikroorganismen, d. h. auf bestimmte, diesen angehörenden Bestandteile eingestellt sind, Preßsäfte aus diesen zu verwenden. Meist scheitert jedoch ihre Anwendbarkeit am Auftreten von Trübungen beim Zusammenbringen von Plasma resp. Serum und Preßsaft. Dazu kommt noch, daß Kontrollversuche notwendig sind, weil im Preßsaft der Mikroorganismen auch Fermente enthalten sind.

Bis jetzt erwiesen sich durch partielle Hydrolyse gewonnene Produkte am geeignetsten. Es sei die Darstellung von Seidenpepton genau geschildert.

Darstellung von Seidenpepton.

Als Ausgangsmaterial verwendet man Seidenabfälle. Diese werden, nachdem sie 48 Stunden bei 100° getrocknet worden sind, in 70%ige (Vol. Proz.) Schwefelsäure eingetragen. Am besten geht man von 1 *kg* Seidenabfällen aus und verwendet die 5fache Menge Schwefelsäure. In neuerer Zeit hat Verfasser aber auch weniger angewandt. Bei Verwendung der 3fachen Menge waren die Resultate noch ganz gute, während die Anwendung der 2fachen Menge unbefriedigende Resultate ergab. Es traten dabei schwer

lösliche gallertige Produkte auf, die die weitere Verarbeitung sehr störten. Die schwefelsaure Lösung läßt man 4 Tage lang bei 25° stehen. Dann wird die Lösung mit der 10fachen Menge Wasser verdünnt, nachdem vorher das Gefäß mit der Seidenpeptonlösung in Eis gestellt worden ist.

Nun entfernt man die Schwefelsäure durch Zusatz der berechneten Menge an festem, feingepulvertem Baryumhydroxyd. Hierbei wird fortwährend umgerührt. Am besten turbiniert man das Gemisch. Nach etwa 12stündigem Stehen wird dann das Baryumsulfat durch doppelte Faltenfilter filtriert oder durch mit Tierkohle getränkte, gehärtete Filter abgenutscht. Der Baryumsulfatniederschlag wird wiederholt in der Reibschale mit destilliertem Wasser von 25° zerrieben und wieder durch Filtration oder durch Dekantieren vom Waschwasser getrennt. Verfolgt man keine besonderen Zwecke, so kann man den Baryumsulfatniederschlag auch mit Wasser auskochen. Eine Gefahr ist nur dann vorhanden, wenn die Neutralisation der Schwefelsäure mit Baryt keine genügende war, d. h. wenn noch ein Überschuß an Schwefelsäure oder an Baryt vorhanden ist. Durch das Kochen besteht dann die Möglichkeit eines weiteren Abbaues des Peptons bis zu Aminosäuren. Nachdem man sich nochmals überzeugt hat, daß die vereinigten Filtrate vom Baryumsulfatniederschlag frei von Schwefelsäure und Baryt sind, wird unter vermindertem Druck bei einer 40° des Wasserbades nicht übersteigenden Temperatur eingeengt. Meistens verläuft die Destillation ganz glatt, manchmal jedoch verhindert lebhaftes Schäumen der Flüssigkeit das Einengen. In diesem Fall kommt man am besten zum Ziel, wenn man die Seidenpeptonlösung während der Destillation aus einem Scheidetrichter in den Destillationskolben eintropfen läßt. Hat man die Seidenpeptonlösung auf ein kleines Volumen gebracht, dann prüft man noch einmal auf Schwefelsäure und Baryt. Aus unbekannter Ursache entziehen sich oft ganz beträchtliche Mengen von Baryt dem Nachweis. Es empfiehlt sich, auf alle Fälle eine Probe einzudampfen und zu veraschen. Ergibt sich ein Baryum enthaltender Rückstand, dann verdünnt man am besten die Seidenpeptonlösung und erwärmt sie auf etwa 60° und fügt nunmehr die berechnete Menge Schwefelsäure hinzu. Gewöhnlich gelingt es dann leicht, die letzten Reste von Baryt zu entfernen. Nunmehr engt man die Seidenpeptonlösung noch weiter ein, bis sie dickflüssig wird. Jetzt trägt man die gelbbraun gefärbte Lösung unter beständigem Rühren in absoluten Alkohol ein. Dabei fällt das Seidenpepton in Form von hellgelb gefärbten bis farblosen Flocken aus. Es ist von Wichtigkeit, das Zugießen der Seidenpeptonlösung zu einer bestimmten Menge Alkohol nur so lange fortzusetzen, als das Seidenpepton sich sofort in fester Form und möglichst farblos abscheidet. Sobald das Seidenpepton in Sirupform im Alkohol untersinkt, muß der Zusatz von Seidenpeptonlösung abgebrochen werden, d. h. man nimmt eine neue Menge Alkohol und beobachtet hier dieselben Vorsichtsmaßregeln wie vorher. Man kann so aus 1 *kg* Seidenabfällen leicht 200—300 *g* und mehr Seidenpepton erhalten. Dampft man die alkoholischen Filtrate nochmals ein

und wiederholt man den ganzen Prozeß, so kann man noch ganz beträchtliche Mengen von brauchbarem Seidenpepton gewinnen.

Noch reinere Präparate von Seidenpepton erhält man, wenn die wässerige Seidenpeptonlösung möglichst stark eingedampft und dann der Rückstand mit Methylalkohol ausgekocht wird. Die heiße methylalkoholische Lösung wird dann in absoluten Äthylalkohol eingetragen. Die so dargestellten Präparate lösen sich in Wasser sehr leicht und geben eine hellgelb gefärbte Lösung. Die Reaktion der Lösung ist schwach sauer bis amphoter. Die Substanz ist nicht hygroskopisch. Noch reinere Präparate, die speziell für die optische Methode zu empfehlen sind, werden gewonnen, wenn die wässerige Seidenpeptonlösung aus 1%iger Lösung mit 10%iger Phosphorwolframsäurelösung gefällt wird. Wird der Niederschlag in der üblichen Weise mit Baryt zerlegt, dann erhält man schneeweißes Seidenpepton, das vollständig luftbeständig ist und absolut farblose Lösungen gibt.

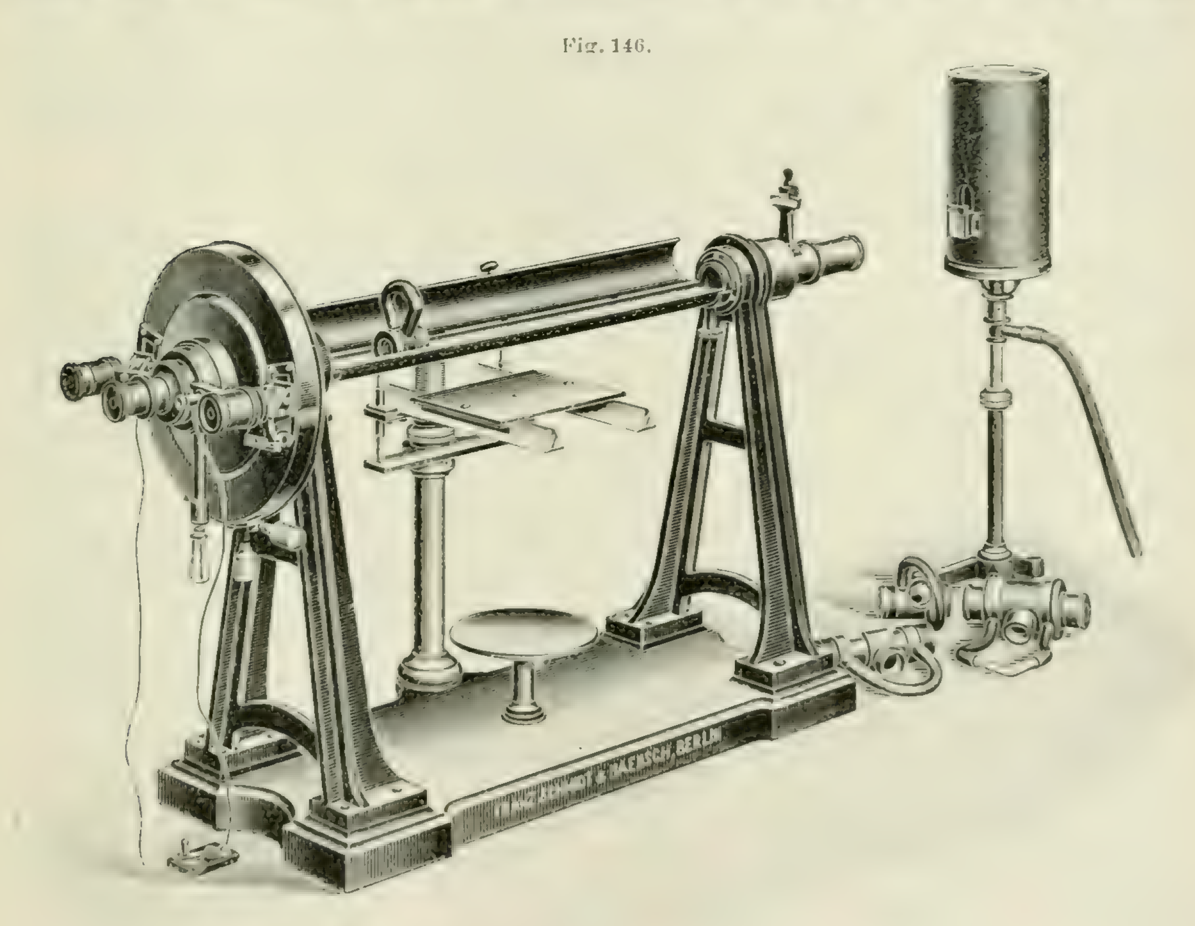
In genau der gleichen Weise können nun auch Organe, Mikroorganismen etc. partiell hydrolysiert werden. Die Erfahrung muß von Fall zu Fall zeigen, ob der Abbau ein genügender ist oder ob er gar so weit gegangen ist, daß die spezifische Struktur des Proteins ganz verwischt worden ist. Hier lassen sich keine allgemeinen Regeln angeben. Man ist auf die Versuche selbst angewiesen. Bis jetzt sind aus Rotzbazillen, Tuberkelbazillen, Staphylokokken, aus Tier- und Menschenblut, aus Plazenta, aus den verschiedenartigsten Organen und zahlreichen Proteinen durch partielle Hydrolyse Produkte gewonnen worden, die sich beim Suchen nach Fermenten bewährten. Selbstverständlich muß das Substrat genügend organische Substanz enthalten und in einer Konzentration anwendbar sein, die ein deutliches Drehungsvermögen aufweist. Geht man von Lösungen aus, die sehr verdünnt sind, so kann man nicht erwarten, deutliche Drehungsänderungen zu beobachten.

Es empfiehlt sich im allgemeinen, mit 10%igen Lösungen der Peptone in isotonischer Kochsalzlösung zu arbeiten. Diese müssen vollständig klar und farblos sein. Sind Trübungen vorhanden, dann muß filtriert werden. Oft genügt die Filtration durch ein gewöhnliches Filter. Kommt man damit nicht zum Ziele, dann saugt man die Lösung am besten durch eine Chamberlandkerze. Um gut vergleichbare Versuche durchführen zu können, ist es sehr wünschenswert, von einer größeren Menge einer bestimmten Peptonlösung auszugehen. Sie läßt sich leicht aufbewahren, indem man das Pepton in physiologischer Kochsalzlösung löst, die man vorher mit Chloroform geschüttelt hat. Oder man überschichtet die Lösung des Peptons in physiologischer Kochsalzlösung mit Toluol. Die einzelnen Proben entnimmt man dann mit einer Pipette.

Die größte Schwierigkeit in der Anwendung der Methode ergibt sich aus dem Verhalten der Peptonlösung gegenüber dem Plasma respektive Serum. Daß dieses selbst vollständig frei von Bestandteilen der Formelemente des Blutes sein muß, wurde oben schon betont. Ist die Peptonlösung sorgfältig dargestellt worden, so bleibt das Gemisch von

Pepton und Blutflüssigkeit meist ganz klar. Enthält dagegen die Lösung noch Spuren von Baryt oder Schwefelsäure oder sonstige zum Pepton nicht hinzugehörende Stoffe, wie z. B. reichlich Salze, dann sind Trübungen bis Fällungen unvermeidbar. *Auf die Darstellung des Peptons muß die allergrößte Sorgfalt verwendet werden.* Bei allen wichtigen Versuchen sind nur gereinigte Peptone zu verwenden. Das Abfiltrieren entstandener Trübungen empfiehlt sich nicht. Einmal können in den Niderschlag Fermente hineingegangen sein und ferner kann der Hauptteil des Substrates mitgefallen sein. Sobald sich hier Schwierigkeiten ergeben, prüfe man sorgfältig das verwendete Pepton. In einzelnen Fällen erwies es sich als vorteil-

Fig. 146.



haft, die Peptonlösung mit Phosphatgemisch zu versetzen. Eine allgemeinere Erfahrung über den Nutzen dieses Zusatzes liegt nicht vor. Bemerkt sei noch, daß die Peptonlösung an und für sich auch bei längerer Aufbewahrung sich nicht trüben darf. Tritt eine Trübung in der Stammlösung auf, dann untersuche man genau die Ursache der Veränderung. Haben sich Mikroorganismen angesiedelt, dann ist die Lösung sofort zu verwerfen.

Im allgemeinen verwendet Verfasser 1 cm^3 *Plasma* und 1 cm^3 der 10%igen *Peptonlösung*, dazu kommt dann, um das Polarisationsrohr zu füllen, physiologische Kochsalzlösung. Da Temperaturunterschiede nicht ohne Einfluß auf das Drehungsvermögen von Lösungen sind, ist es von größter Wichtigkeit, während der ganzen Beobachtungsdauer bei gleicher Tem-

peratur zu arbeiten. Fast alle bisherigen Untersuchungen sind bei 37° ausgeführt worden. Verwendet man zu den Versuchen die gewöhnlichen Polarisationsrohre, dann läuft man Gefahr, daß während des Ablesens die Temperatur sinkt. Bei großer Übung reduziert sich die Ablesungszeit auf ein Minimum. Besser ist es auf alle Fälle, Polarisationsrohre anzuwenden, die von einem Mantel umgeben sind, der mit Wasser gefüllt werden kann. (Vgl. die Fig. 146.)

Am besten geht man so vor, daß man den Mantel des Polarisationsrohres mit Wasser von ca. 45° füllt. Man kontrolliert dann mit dem Thermometer, bis der Mantel eine Temperatur von 37° zeigt. Jetzt füllt man das Gemisch ein. Es ist unter allen Umständen besser, das ganze Gemisch in einem Reagenzglas vorzubereiten und nicht im Rohr selbst zu mischen. Trübungen lassen sich so leicht vor dem Einfüllen erkennen. Das Polarisationsrohr wird nicht gleich verunreinigt und steht zu weiteren Versuchen bereit, falls eine Probe unbrauchbar ist.

Nun wird sofort das Drehungsvermögen abgelesen. Zu all diesen Versuchen ist unter allen Umständen ein erstklassiges Instrument notwendig. Arbeitet man mit einem der gewöhnlichen Polarisationsapparate, dann läuft man Gefahr, durch Ablesungsfehler große Täuschungen zu erleben. Bewährt hat sich bis jetzt nur der dreiteilige *Landolt-Lippich*sche Polarisationsapparat. Er wird von der Firma *Schmidt & Hänsch*, Berlin, nebst den nach den Angaben des Verfasser für diesen Zweck konstruierten Polarisationsröhren geliefert (vgl. die nebenstehende Abbildung). Nur Untersuchungen, die mit einem sehr guten Polarisationsapparat ausgeführt sind, haben Anspruch auf Zuverlässigkeit. Die Ausschläge, die man bei derartigen Untersuchungen erhält, sind naturgemäß keine großen. Die einzelne Ablesung muß daher mit großer Exaktheit vorgenommen werden können.

Am besten läßt man der sofortigen Ablesung nach 5 Minuten eine zweite folgen. Nun hat das ganze Gemisch sicher 37°. Von nun an liest man in bestimmten Zeitabschnitten regelmäßig ab. Meist genügt es, wenn alle Stunde abgelesen wird. Mehr als zwei Tage wird man meist nicht beobachten. Unter allen Umständen muß man Kontrollversuche ausführen, und zwar bei jedem Einzelversuch. Einmal ist das Pepton als solches zu prüfen, dann wird ein Rohr gefüllt mit der Peptonlösung und Plasma respektive Serum von einem normalen Tier und endlich läßt man gleichzeitig einen Versuch mit dem inaktivierten Plasma (Erwärmen auf 60°) laufen. Durch die Kontrollversuche schließt man Täuschungen aus. Man wird auch nie sich mit einem Versuch begnügen dürfen. Nur der mehrfach erhobene gleichsinnige Befund ist von Wert.

Meist verlaufen die Versuche in der geschilderten Weise ganz glatt. Die Resultate lassen sich in Kurven wiedergeben. Auf der Ordinate zeichnet man z. B. die in bestimmten Zeiten festgestellte Drehung auf, und auf der Abszisse trägt man die Zeiten ein.

Unbrauchbar werden die Versuche, wenn während der Beobachtung sich Trübungen und Fällungen zeigen. Es ist besser, in solchen Fällen den

Versuch abzubrechen. Durch das Ausfallen organischer Substanzen kann an und für sich eine Drehungsänderung auftreten, ohne daß eine Fermentwirkung vorliegt. Setzt sich der Niederschlag im Rohr ab, dann kann man in besonderen Fällen auch weiter beobachten. Man muß in diesem Fall dann nur die Drehungsänderung vor der Fällung in Betracht ziehen und dann gewissermaßen für die weitere Beurteilung des Verlaufs des Versuches die nach der Fällung festgestellte Drehung als Anfangsdrehung betrachten. Man wird so vorgehen können, wenn es sich um kostbares Material handelt oder wenn man zunächst nur orientierende Versuche vornimmt.

Was die Länge der Polarisationsrohre anbetrifft, so wird man im allgemeinen mit 1 *dm*-Röhren auskommen. Nur, wenn die Lösung infolge des Farbstoffgehaltes des Plasmas in größerer Schicht nicht genügend durchsichtig ist[1]), wird man $1/2$ oder gar $1/4$ *dm*-Rohre anwenden.

Letztere eignen sich vorzüglich zur Bestimmung des Drehungsvermögens von Plasma. Auch zum Studium der Präzipitinbildung eignen sich diese kurzen Rohre sehr gut. Bringt man zwei Sera zusammen, so wird sich das Drehungsvermögen beider addieren, wenn nicht besondere Verhältnisse vorliegen. Hat man Sera, die aufeinander eingestellt sind, dann lassen sich oft deutlich beim Vermischen Werte beobachten, die mit dem berechneten nicht übereinstimmen. Hier liegt noch ein weites Feld zu umfassender Anwendungsweise der Methode vor.

Die Anwendungsweise der optischen Methode zur Prüfung auf Drehungsänderung bei Verwendung von Plasma und Peptonlösung kann in genau der gleichen Weise auch auf Polypeptide und Kohlehydrate übertragen werden. Selbstverständlich kann auch ein eventueller Abbau von Nukleinsäuren und deren Abbauprodukten verfolgt werden. Es sei ein Beispiel angeführt. Ein Polarisationsrohr, das 8 cm^3 faßt, wird gefüllt mit einem Gemisch von 0·5 cm^3 Serum, 0·5 cm^3 einer 5%igen Rohrzuckerlösung und 7 cm^3 physiologischer Kochsalzlösung. Nun wird die Anfangsdrehung festgestellt und dann von Zeit zu Zeit die Drehung abgelesen.

Zum Schlusse sei nochmals betont, daß die optische Methode nur als eine Pfadfinderin aufzufassen ist. Sie darf nie allein zur Entscheidung eines bestimmten Problems verwendet werden. Die Verfolgung respektive Feststellung des Drehungsvermögens von Körperflüssigkeiten mit und ohne Zusatz bestimmter Substrate ergibt in vielen Fällen Einblick in Vorgänge, auf die wir sonst nicht so leicht aufmerksam werden. Sind einmal bestimmte Beobachtungen gemacht, dann müssen direkte Methoden den ganzen Vorgang analysieren.

[1]) *Schmidt & Hänsch* liefern Apparate mit Nernststift und Farbenfiltern, die der Anwendung der optischen Methode ein noch weiteres Feld sichern, als es bis jetzt der Fall war.

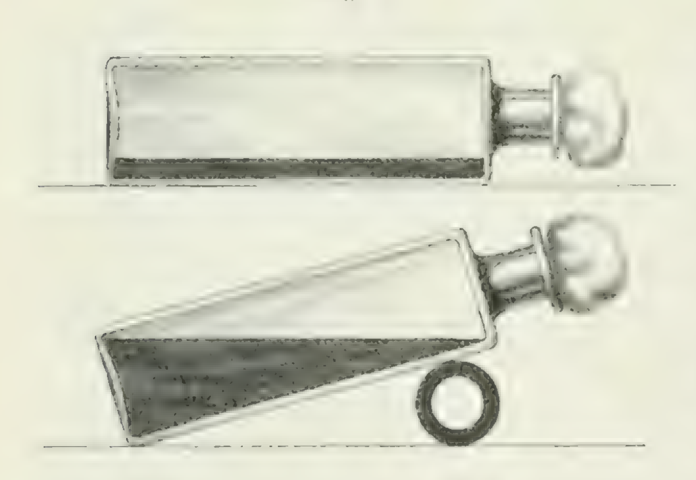
Die wichtigsten Methoden beim Arbeiten mit Pilzen und Bakterien.

Von **Franz Fuhrmann**, Graz.

Anlage von Massenkulturen auf schräg erstarrten Nährsubstraten.

Man benützt als Nährböden entweder Nährgelatine, Nähragar, Blutserum oder Gemische der genannten Nährsubstrate. Nach dem Vorgange von *Paul Lindner*[1]) dienen vierkantige Glasflaschen von etwa 50—60 cm^3 Rauminhalt als Kulturgefäße. Diese Kulturflaschen werden wie Eprouvetten mit einem Watteverschluß versehen und vor dem Einfüllen des Nährmittels im Heißluftschrank bei 155 bis 160° C 2 Stunden trocken sterilisiert. Je nachdem man eine dickere, schräg erstarrte oder dünnere flacherstarrte Nährbodenschichte benützen will, füllt man mehr oder weniger vom verflüssigten Nährsubstrat ein, sterilisiert dreimal diskontinuierlich und läßt dann erstarren. Dabei liegt die Flasche mit ihrer Breitseite entweder eben am Tisch oder schräg durch Anbringen einer Unterlage. Nebenstehende Fig. 147 zeigt uns die Kulturflasche mit dem Nährsubstrat beschickt auf dem Tisch eben liegend und unterstützt zum schrägen Erstarren des Nährbodens. Mit *Lindner* übereinstimmend sei, abgesehen von ihrer geringeren Zerbrechlichkeit, als Vorteil derselben besonders hervorgehoben, daß sie ohne Gestell von selbst sicher und fest steht. Außerdem bieten diese Kulturen die Annehmlichkeit, beträchtliche Mengen von Bakterienmaterial auf der großen Nährboden-

Fig. 147.



Kulturflasche nach *Paul Lindner*.

[1]) *Paul Lindner*, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. S. 207. Berlin, Paul Parey, 1909.

oberfläche zu erhalten, ohne Verunreinigungen befürchten zu müssen, die bei der Verwendung von Platten in Petrischalen zu Massenkulturen sich nur allzuleicht einschleichen. Durch den verhältnismäßig engen Hals des Kulturgefäßes findet auch bei längerer Zuchtdauer nur eine geringe Verdunstung statt, so daß der Nährboden sehr lange Zeit hindurch nicht nennenswert eintrocknet. Zur Erzielung von Massenkulturen empfiehlt es sich, die Verimpfung durch Übergießen mit der Bakterienemulsion vorzunehmen. Man schwemmt in einem Proberöhrchen mit steriler 0·75%iger Chlornatriumlösung eine Reinkultur der betreffenden Bakterienart auf und gießt nach Abflammung des Proberöhrchenrandes und des Randes der Kulturflasche die Bakterienaufschwemmung in das Kulturgefäß, bedeckt damit durch vorsichtiges Neigen die ganze Nährbodenoberfläche und schüttet den Überschuß weg. Der benetzte Flaschenhals wird in der Flamme vorsichtig bis zum Trocknen erwärmt, dann kurze Zeit erhitzt und hierauf der Wattebausch wieder eingesetzt. Auf diese Weise bedeckt man die ganze Nährbodenoberfläche gleichmäßig mit Bakterien und erhält innerhalb weniger Tage eine Massenkultur, die man mit der sterilen Platinöse leicht abheben kann.

Burris Tuscheverfahren zur Reinkultur aus einer Zelle.[1]

Das Tuscheverfahren von *Burri* eignet sich zur Reinkultur aus einer einzelnen Zelle für alle züchtbaren Bakterienarten, Hefen- und Schimmelpilze und kann wegen seiner leichten Ausführbarkeit bestens empfohlen werden. Außerdem bietet es für das Studium der Koloniebildung und der Vermehrung der Bakterien ein wertvolles Hilfsmittel.

Das Verfahren besteht aus zwei Teilen, der Isolierung des Keimes und der Zucht desselben. Der erste Teil, die Isolierung, ist in allen Fällen die gleiche. Die Zucht dagegen kann allen Ansprüchen der betreffenden Mikrobenart angepaßt werden, da der einmal isolierte Keim leicht in jedes beliebige Nährsubstrat eingebracht und unter den verschiedensten Bedingungen gehalten werden kann. Zur Ausführung der Isolierung braucht man folgende Gerätschaften.

1. Eine Glasglocke von 10—15 *cm* Durchmesser.

2. Sterile Objektträger größeren Formates. Sehr zweckmäßig sind solche vom Formate 76 : 35 *mm*. Die Objektträger sind entweder durch Erhitzen in der Flamme unmittelbar vor dem Gebrauche zu sterilisieren oder in kupfernen Büchsen im Heißluftsterilisator keimfrei zu machen. Sie müssen sehr gut entfettet sein. Am besten ist es, die Objektträger mit alkalireicher Waschseife und Wasser unter Zuhilfenahme eines entfetteten Wattebausches zu reinigen und senkrecht aufgestellt zu trocknen.

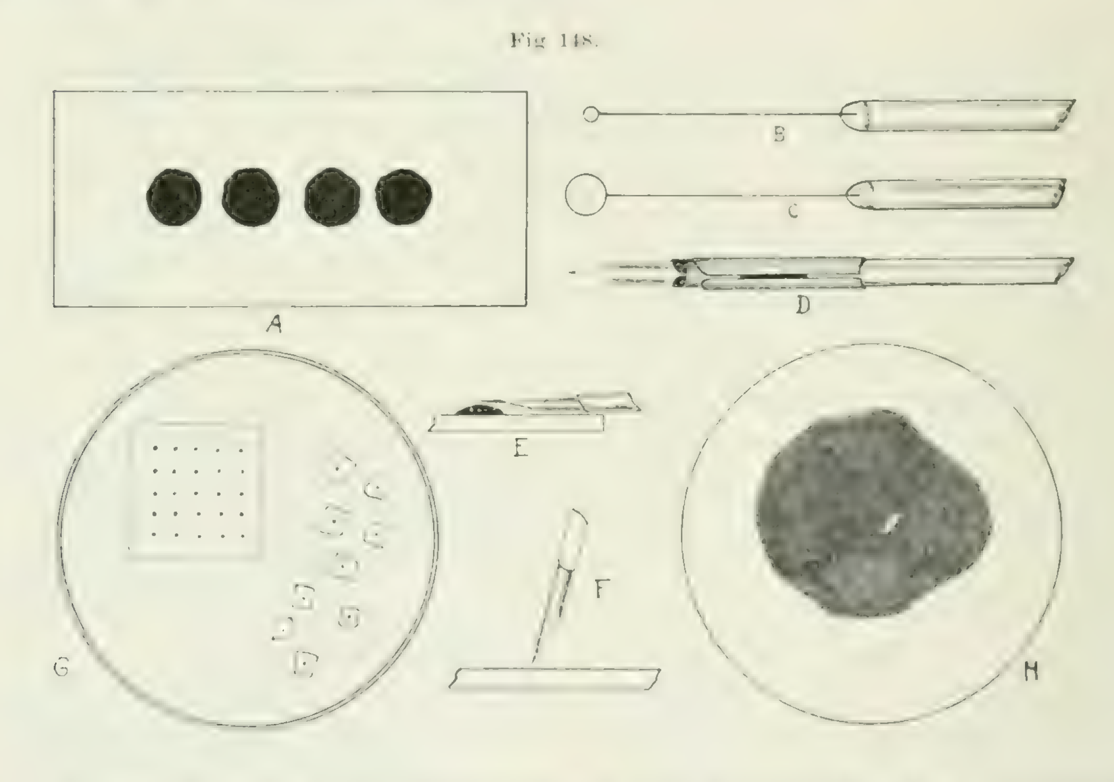
3. Sterile Deckgläser vom Formate 18 : 18—20 : 20 *mm* und sterile Deckglassplitter von ungefähr 3—5 *mm* Seitenlänge. *Burri* sterilisiert die Deckgläser zwar unmittelbar in der Flamme, dabei gehen aber ziemlich

[1]) *Robert Burri*, Das Tuscheverfahren. Jena, Gust. Fischer, 1909.

viele zugrunde, zumindest verbiegen sich die meisten ein wenig. Aus diesem Grunde ist es zweckmäßiger, sich gut gereinigte Deckgläser auf Vorrat im Heißluftschrank zu sterilisieren. Die Deckgläschen kommen zum Sterilisieren in höhere Glasdosen mit Falzdeckel und bleiben darinnen gebrauchsfertig aufbewahrt. Das Gleiche gilt für die Deckglassplitter, die man aus Deckglasabfall mit dem Diamantstift herstellt.

4. Dann benötigt man frisch gegossene, sterile Gelatineplatten in Petrischalen. Man verwendet eine 10%ige Fleischwassergelatine. Nach *Burri* können die Platten einige Tage alt sein. Ich habe mit älteren Platten weniger gute Erfahrungen gemacht, da infolge der oberflächlichen Austrocknung die aufgesetzten Tuschetropfen sehr häufig zu dick ausfallen und sich sehr ungleichmäßig ausbreiten.

Fig. 148.



5. Zum Auftragen der Tuschetropfen auf dem Objektträger verwendet man eine geschlossene Öse von 4—5 *mm* Durchmesser. Die Verteilung des Impfmateriales in den Tropfen bewirkt man mit einer Öse von 1 *mm* Öffnung. In Fig. 148, *B* und *C* sind die beiden Ösen abgebildet.

6. Zur Verimpfung von den Tropfen auf die Gelatineplatte dient eine feine Feder (Zeichenfeder) mit tadelloser Spitze. Die Feder sitzt in einem Halter, der an Stelle des Holzstieles einen Glasstab zum Halten besitzt. *D* der Fig. 148 zeigt uns die montierte Zeichenfeder.

7. Flüssige Tusche. Es empfiehlt sich die Verwendung der für diese Methode besonders von *Günther-Wagner* hergestellten Tusche, die von *Grübler & Comp.* in Leipzig in zugeschmolzenen Glasröhren erhältlich ist. Die Originaltusche wird mit 9 Teilen destillierten Wassers verdünnt und dann $^1/_2$ Stunde bei $^1/_2$ Atmosphäre Druck im Autoklaven sterilisiert. Man tut gut, die verdünnte Tusche in Proberöhrchen in Portionen von etwa 10 cm^3

abzuziehen, mit einem Wattebausch zu verschließen und dann erst im Drucktopf zu sterilisieren. Nach der Sterilisation, nachdem die Watteverschlüsse vollständig ausgetrocknet sind, stülpt man über dieselben noch Zinnkapseln, um ein Eintrocknen des Inhaltes nach Möglichkeit hintanzuhalten. Zusätze von Salzlösungen oder Nährsubstraten zur Tusche bewirken eine Ausflockung und sind zu vermeiden.

Die Tuschemethode fußt nun darauf, daß in der dünnen Tuscheschichte die Bakterien und Hefen, bei durchfallendem Licht betrachtet, als helle Stellen besonders ausgezeichnet sichtbar sind. Wenn man nun in der Tusche Bakterienmaterial so verteilt, daß kleinste Tröpfchen der Tuschebakterienmischung meistens nur 1 Zelle enthalten, so ist diese in dem kleinen Tropfen gut sichtbar, bzw. es ist leicht, jene Tropfen auszuwählen und anzumerken, die nur eine Zelle enthalten. Der mit dem sterilen Deckglas bedeckte Tuschetropfen mit der einen Zelle kann nun dauernd beobachtet und die Koloniebildung untersucht werden. Abimpfungen der entstandenen Kolonie ergeben also sicher Kulturen, die nur von einer einzigen Zelle abstammen. Überdies bleibt beim Abheben des Deckgläschens der Tuschetropfen samt der einzelnen Bakterienzelle an demselben haften und kann so in jedes beliebige Nährsubstrat übertragen werden. Man erhält dann dort eine Kultur, ausgehend von einer einzigen Zelle. Diese Eigenschaft des Haftenbleibens macht diese Reinzuchtmethode so außerordentlich wertvoll. Viele Bakterien, wie gewisse Spirillen, Purpurbakterien, Eisenbakterien etc., sind mit Hilfe der gallertigen Nährsubstrate schwierig oder häufig gar nicht rein zu kultivieren. Mit dem Tuscheverfahren gelingt es sehr leicht, indem man einfach eine Zelle in das sterilisierte Ausgangsmaterial (Teichwasser etc.) hineinverimpft.

Tusche verhält sich übrigens gegenüber manchen Bakterienarten als wachstumshemmend, weshalb sicher zum Ziele bei allen Arten nur die Isolierung mit sofortiger nachheriger Übertragung der einzelnen Zelle in ein neues flüssiges Substrat führt. Man trachte daher immer, so rasch als möglich zu arbeiten. Der Arbeitsgang ist nun folgender:

Um möglichst staubfrei zu arbeiten, überwischt man den Arbeitstisch mit 50%igem Alkohol. Man gießt dann mit 10%iger Nährgelatine Platten in *Petri*sche Schalen. Nach dem Erstarren derselben entnimmt man dem Kupferblechbehälter einen sterilen Objektträger oder sterilisiert einen solchen durch Erhitzen in der Flamme. Nach dem Erkalten legt man ihn auf den Tisch und bedeckt ihn sofort mit der Glasglocke. Jetzt glüht man die beiden Platinösen aus und sterilisiert die Zeichenfeder durch vorsichtiges Erhitzen in der Flamme. Man zieht zu dem Ende die Feder samt dem Halter rasch einige Male durch die Flamme. Sie darf aber nicht glühend werden, damit die Spitze nicht leidet. Nun stellt man noch ein Glas mit Wasser handgerecht in die Nähe.

Man bringt nun rasch vier Tropfen Tusche mit der großen Öse auf den sterilen Objektträger, etwa in der Anordnung, wie *A* der Figur 148

zeigt. Damit die Tusche in der Öse nicht eintrocknet und einen Aschenrückstand beim Glühen gibt, spült man im bereitstehenden Wasser die Öse kurz ab. Jetzt entnimmt man mit einer Platinnadel etwas Bakterienmaterial und verteilt es rasch und tüchtig in den ersten Tuschetropfen. Nun bringt man mit der kleinen Öse ein wenig vom ersten Tropfen in den zweiten, verteilt wieder gleichmäßig, vom zweiten in den dritten usf. Jetzt taucht man in den letzten Tropfen die Feder mit der konkaven Seite ein, wobei man den Halter möglichst horizontal hält, wie es *E* der Figur 148 zeigt. Auf der Gelatineplatte erzeugt man hierauf rasch kleine Tuschpunkte, indem man bei fast senkrechter Haltung der Feder die Spitze derselben mit der Gelatineoberfläche kurze Zeit eben in Berührung bringt, ohne die Gallerte zu verletzen. Die Federhaltung ist in Figur 148 *F* wiedergegeben. So führt man in nächster Nähe 6—8 Punkte aus und kontrolliert mit der *D*-Linse von *Zeiß* und einem stärkeren Okular die Tröpfchen sofort unter dem Mikroskop auf ihren Bakteriengehalt. Finden sich keine Tröpfchen mit einer Zelle, sondern nur solche mit mehreren, so legt man eine neue Verdünnungsreihe an. Sehr bald bekommt man für die Beurteilung der Impfmenge eine große Übung. Außerdem dürfen die Tröpfchen nicht größer ausfallen als das Gesichtsfeld der Zeißlinse *F* oder wenigstens *E*, um den ganzen Tropfen auf einmal überschauen und durchmustern zu können. Stimmt die Verdünnung und die Tropfengröße, dann schreitet man auf einer frischen Gelatineplatte zur endgültigen Reinzucht. Will man unmittelbar auf der Platte züchten, dann bringt man die Tuschepunkte so an, daß regelmäßig in einem Geviert verteilt, auf 18 *mm* Seitenlänge je 5—6 Punkte kommen. *G* der Figur 148 zeigt uns links unter einem Deckglase die Anordnung der Punkte für diesen Zweck.

Jetzt spült man die Feder in Wasser ab oder bei pathogenen Arten am besten in einer Formollösung und trocknet mit einem weichen Tuche ab. Nunmehr bedeckt man die Tuschepunkte mit einem sterilen Deckglas und mikroskopiert bei stärkerer Vergrößerung Tropfen für Tropfen. Alle jene Tröpfchen werden notiert, die nur eine einzige Zelle enthalten. In Figur 148 *H* ist ein solcher Tropfen mit nur einer Stäbchenbakterienzelle abgebildet. Er füllt das durch eine Kreislinie angedeutete objektive Gesichtsfeld der *F*-Linse von *Zeiß* nicht einmal aus. Sobald sich nach einigen Stunden oder Tagen eine kleine Kolonie von der einzelnen Zelle ausgehend gebildet hat, impft man nach Abnahme des Deckgläschens unter mikroskopischer Kontrolle mit der Impfnadel in einen beliebigen Nährboden ab.

In vielen Fällen wird man so zum Ziele kommen, in der Mehrzahl der Untersuchungen aber nicht. Denn abgesehen davon, daß die Tusche selbst auf zahlreiche Bakterienarten wachstumshemmend wirkt, ist Nährgelatine an und für sich ein Nährsubstrat, das sich vielfach zur Zucht nicht eignet. Weitaus besser ist es daher, die Gelatine zur Isolierung zu verwenden und in einem anderen tauglicheren Substrat zu züchten.

In diesem Falle verfährt man folgendermaßen: Es werden die Verdünnungen wie früher angegeben angelegt, dann die Probetropfen auf einer Gelatine gemacht und bei entsprechender Verdünnung die endgültigen Tröpfchen sofort auf einer neuen Gelatineplatte hergestellt. Man macht sie aber nicht regelmäßig in kleinen Abständen, sondern in größeren Abständen von 10—20 *mm*. Dann bedeckt man jedes Tröpfchen mit einem sterilen Deckglassplitter, der mit einer sterilen Federzange aufgelegt wird. Nun untersucht man die einzelnen Tröpfchen mikroskopisch und hebt mit der sterilen Pinzette diejenigen Deckplättchen wieder ab, unter denen ein Tröpfchen mit einer einzigen Zelle sich befindet. Dabei bleibt das Tuschetröpfchen samt der Zelle auf dem Deckgläschen haften. So gelingt es, mit dem Deckgläschen die isolierte Zelle in jedes beliebige Nährsubstrat zu übertragen, wo dann die Vermehrung erfolgt. So wird man bei strengen Anaërobiern die einzelne Zelle in ein Röhrchen mit verflüssigtem, auf 40° C abgekühlten Agar einbringen und nach dem Untersinken sofort in Eis oder kaltem Wasser erstarren lassen. Manche Leuchtbakterien erweisen sich gegen Tusche empfindlich, weshalb man hier ebenfalls das Tuscheverfahren nur zur Isolierung allein benutzt und die isolierte Zelle ungesäumt in einen passenden flüssigen Nährboden einträgt.

Der Arbeitsgang ist zusammengefaßt kurz folgender:

1. Anlage der vier Verdünnungen in den großen Tuschetropfen auf dem Objektträger.

2. Herstellung der Probetröpfchen auf einer Gelatineplatte.

3. Mikroskopie der Probetröpfchen mit einem stärkeren Trockensystem in unbedecktem Zustande.

4. Wenn die Verdünnung richtig, Anlage der endgültigen Tuschtröpfchen mit der Feder.

5. Bedeckung derselben mit einem sterilen Deckglas oder sterilen Deckglassplittern, entsprechend dem verfolgten Zweck (Isolierung und Wachstum oder nur Isolierung).

6. Mikroskopie der einzelnen Tröpfchen, Bezeichnung der Tröpfchen mit einer Zelle im ersten Falle, Abtragen und Einbringen der Tröpfchen mit einer Zelle in beliebige andere Nährmittel im zweiten Falle.

Selbstverständlich wird man bei Isolierung mit nachheriger Übertragung der einzelnen Zelle immer eine Reihe von 6—10 Einzelkulturen anlegen, da man es der Bakterienzelle ja nicht ansehen kann, ob sie auch bei der Übertragung lebend war oder nicht.

Gewinnung von Sporen der Hefen auf dem Gipsblocke.

Die Sporenbildung bei den Saccharomyzeten pflegt dann am besten und schnellsten einzutreten, wenn die Zellen sich in gutem Ernährungszustand befinden, sofern die übrigen für die Sporulation wesentlichen Bedingungen eingehalten werden. Diese bestehen darin, die wohlgenährten

Zellen auf nahrungsarme oder nahrungsfreie Substrate zu bringen, die feucht gehalten und dem Luftsauerstoff leicht zugänglich sind. Wohl als beste Unterlage bewährte sich der Gipsblock oder der in die Eprouvette eingelegte Gipsstreifen. Zur Feuchthaltung dient steriles Leitungswasser. Der ursprünglich von *Engel* schon angegebene Gipsblock wurde dann von *Emil Christian Hansen* zweckentsprechend abgeändert und in dieser oder ähnlicher Form auch jetzt für die Sporenuntersuchungen bei der Hefe verwendet. Der Gipsblock ist ein Kegelstumpf von etwa 3—4 *cm* Höhe und 5—6 *cm* Breite an der Basis; die obere Fläche besitzt einen Durchmesser von 4—5 *cm*. Man stellt sich diese Gipsblöcke auf Vorrat selbst her, indem man 8 Raumteile frischen Gips mit 3 Raumteilen Wasser zu einem steifen Brei verrührt und diesen in eine entsprechende Blechform preßt, die aber nicht gefettet sein darf. Man stellt dabei die Blechform mit der kleinen Fläche auf eine blanke Glasplatte. Nach 2—3 Stunden läßt sich der Block sehr leicht herausdrücken, sofern man darauf achtet, daß die Blechform keine Eindrücke hat. Der frische Gipsblock wird nun gründlich in Wasser ausgekocht und dann in Filtrierpapier gewickelt im Heißluftsterilisator bei 110° durch ein und eine halbe Stunde erhitzt. Dabei trocknet er stark aus und ist dann auch keimfrei. Jetzt ist er gebrauchsfertig. Gleichzeitig bereitet man Schalen mit Deckeln vor, die nur lose aufliegen und der Luft genügend Zutritt gestatten. Diese Schalen sollen für die angegebene Gipsblockgröße eine Höhe von 5 *cm* und einen Durchmesser von 8 *cm* aufweisen. Sie werden in Papier eingewickelt und in der üblichen Weise trocken sterilisiert.

Die Hefe muß für die Gipsblocksporenkultur ebenfalls vorbereitet werden. Man züchte sie möglichst in einem flüssigen Nährsubstrat, und zwar in zwei Generationen, bevor man zur Sporenzucht schreitet. Nach den Untersuchungen von *Hansen*, *Aderhold* u. a. tritt bei Hefen die Sporulation schwer ein, wenn sie längere Zeit in stark alkoholhaltigen Nährsubstraten sich befunden haben. Jede ältere Kultur weist diese Erscheinung auf. Demnach soll die Aussaat zur Sporengewinnung von gutgenährten, jungen Kulturen erfolgen, die in optimalen Ernährungsbedingungen und Temperaturverhältnissen waren. Bierhefen wird man demnach vorher in ungehopfter Bierwürze, Weinhefe in Most usf. züchten. Man legt eine erste Vorkultur an, die man einige Tage bei Zimmertemperatur hält. Wählen wir als Beispiel Bierhefe. Diese verimpfen wir in einen Kolben mit steriler, durchlüfteter, nicht gehopfter Bierwürze und lassen sie einige Tage hindurch gären. Von der entstandenen Bodensatzhefe überimpfen wir mit einem sterilen Glasrohr in eine frische Bierwürze und züchten nunmehr bei 25° C durch 24 Stunden. Es hat sich wieder Bodensatzhefe gebildet, die nun auf einen Gipsblock übertragen wird.

Dabei verfahren wir folgendermaßen:

Der Gipsblock wird aus dem Papier gewickelt und ohne Fingerberührung in die eröffnete, sterile Kulturschale gerollt. Nun entfernt man die über der Satzhefe stehende Flüssigkeit der zweiten Vorkultur durch

sehr vorsichtiges Abgießen. Von der Bodensatzhefe überträgt man nun mit einem sterilen Glasrohr ein wenig auf die obere Fläche des Gipsblockes und breitet sie über die Oberfläche aus. Nunmehr läßt man, ohne die Gipsblockoberfläche zu bespülen, steriles Wasser in die Schale laufen; das Wasser soll anfangs etwas über die Mitte des Blockes reichen. Nachdem er sich von unten völlig durchfeuchtet hat, ist dann gerade der richtige Wasserstand erreicht. Dann schließt man den Schalendeckel und züchtet bei 25° C. Schon nach 24 Stunden werden wir die Anfänge der Sporenbildung beobachten können und nach 48 Stunden reichlich fertige Sporen. Fig. 149 zeigt uns die eben fertig gestellte Gipsblocksporenkultur im Durchschnitt.

Fig. 149.

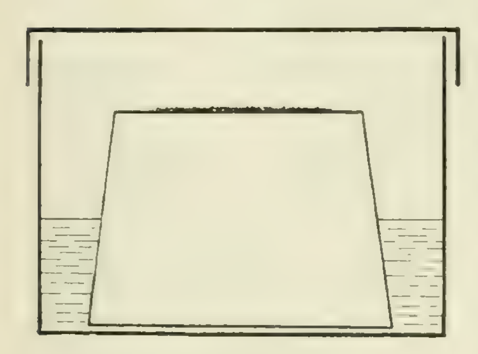
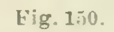


Fig. 150.





Es wird natürlich unter den genannten Versuchsbedingungen besonders bei längerer Beobachtungsdauer schwierig sein, eine solche Sporenkultur rein zu erhalten. Diesem Übelstand abzuhelfen, verwendet *Schiönning* ein Hansenkölbchen, in dem der Gipsblock im kleinen angelegt wird. Man kann sich aber mit Eprouvetten ausgezeichnet helfen, in die man Gipsstreifen einbringt. Für die Herstellung der Gipsstreifen verwendet man rechtwinklig abgebogene Blechstreifen oder Rahmen, wie sie zur Paraffineinbettung benutzt werden. Den obengenannten Gipsbrei bringt man in diese auf Glasplatten liegenden Formen in 3—4 *mm* dicker Schicht. Nach dem Erstarren kocht man die Streifen eine halbe Stunde in Wasser aus und bringt sie noch feucht in die sterilisierten mit Watte verschlossenen Proberöhrchen. Die mit den Gipsstreifen beschickten Röhrchen werden dann 1 Stunde im Trockenschrank bei 110° C erhitzt und sind nun gebrauchsfertig.

Man verimpft das Hefenmaterial mit eine Platinöse auf den oberen Teil des Streifens und läßt nun etwa 1 *cm* hoch steriles Wasser einfließen. Unsere Fig. 150 zeigt die Gipsstreifenkulturröhren fertig im Querschnitt dargestellt.

Diese Sporenzüchtung auf Gipsblöcken und Gipsstreifen fand eigentlich bei den Bakteriologen viel zu wenig Beachtung. Die sporenbildenden Bakterien verhalten sich ganz so wie die Saccharomyzeten. Mit Hilfe dieser Kulturmethoden bekommt man ebenfalls eine außerordentlich rasche und prompte Sporenbildung. Besonders bemerkenswert ist die Gleichmäßigkeit des Vorganges in den meisten ausgesäten Zellen. Natürlich muß man auch hier von jungen, gut genährten und in voller Entwicklung begriffenen

Bakterien ausgehen. Man kann sowohl Flüssigkeits- als auch Agar- oder Gelatinekulturen als Ausgangsmaterial wählen. Aber auch zur Untersuchung der verschiedenen Entwicklungsstadien nicht sporenbildender Bakterienarten ist die Zucht auf der Gipsplatte ausgezeichnet verwendbar, da hier die vielen Involutionsformen sehr in den Hintergrund treten. Man vermeidet ja die Anhäufung schädlicher Stoffwechselprodukte, die diese Formen besonders hervorrufen. Es läßt sich so klar und einwandfrei entscheiden, wie Bakterien, die in voller Lebenskraft sich befinden, auf den Mangel an Nährmaterial reagieren und welche Organisationserscheinungen sich dabei abspielen.

Kultur anaërober Bakterien.

Wenn auch die im V. Band der Arbeitsmethoden beschriebenen Apparate und Versuchsanstellungen zur Gewinnung und Züchtung anaërober Bakterienarten ausreichen, so gestatten sie dennoch nicht, die Sauerstoffminima zu bestimmen, bei denen Wachstum überhaupt noch stattfindet oder die Sporenbildung und Sporenkeimung einsetzt. Für die physiologische Charakterisierung der Mikrobenarten sind solche Untersuchungen aber äußerst wertvoll, wie aus den schönen Arbeiten *Arthur Meyers* und seiner Schüler hervorgeht.

Arthur Meyer[1]) und *G. Bredemann*[2]) haben nun eine Versuchsanordnung zur Bestimmung der Sauerstoffminima angegeben, die in bezug auf Brauchbarkeit und Genauigkeit für biologische Versuche vollauf genügt.

Meyer benutzt eine Art Exsikkator als Kulturgefäß, in dem aus dem darin herrschenden Druck die vorhandene Sauerstoffmenge im Liter in Milligrammen bestimmt wird. Für die Bestimmung der niederen Drucke dient ein in das Kulturgefäß eingehängtes Quecksilbermanometer, während größere Drucke in einem dem Kulturgefäß außen angeschlossenen Quecksilbermanometer gemessen werden. Die Luftverdünnung wird mit einer *Geryk*-Luftpumpe von *Arthur Pfeiffer* in Wetzlar vorgenommen. Letztere soll sich dafür ausgezeichnet bewähren, sofern eine Trockenröhre zwischen Kultur und Pumpe zwischengelegt ist, um eine Durchfeuchtung des Öles der Pumpe sicher hintanzuhalten. Von der Beschreibung der Pumpe kann hier abgesehen werden, da dieselbe im ersten Band der Arbeitsmethoden, S. 138 (samt der Literatur) beschrieben ist. Natürlich können auch Quecksilberluftpumpen an die Stelle der Ölpumpe treten.

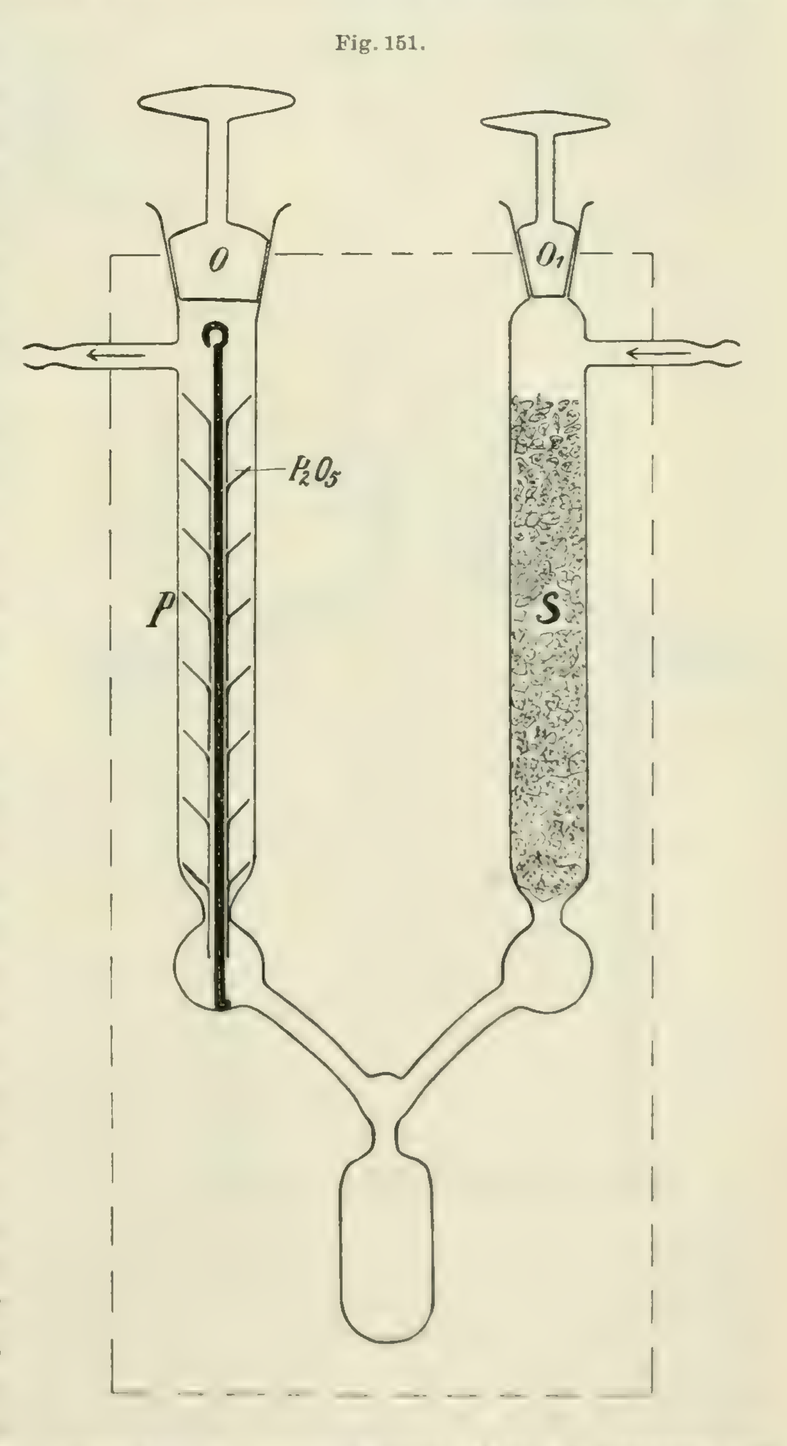
Die „Trockenröhre nach *Arthur Meyer*" ist so zusammengesetzt, daß sie einerseits organische Dämpfe der Kulturen möglichst durch konzentrierte Schwefelsäure absorbiert und andrerseits jede Spur Wasserdampf

[1]) *A. Meyer,* Apparat für die Kultur von anaëroben Bakterien und für die Bestimmung der Sauerstoffminima für Keimung, Wachstum und Sporenbildung der Bakterienspezies. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 15. 1906. S. 337.

[2]) *G. Bredemann,* Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 23. 1909. S. 411.

durch Phosphorpentoxyd entfernt. Wie aus Fig. 151 zu entnehmen ist, besteht dieser Trockenapparat aus einem U-Rohr, an dessen Verbindungsteil noch ein kleines Sammelgefäß für die abtropfende H_2SO_4 angebracht ist. Jeder Schenkel des U-Rohres hat eine Länge von 39 *cm* und eine innere Lichte von 4·5 *cm*. Beide Rohre tragen oben einen seitlichen Rohransatz und sind durch gutsitzende Glasstopfen verschlossen. Der Glasstoppel *O* hat unten einen Durchmesser von 4·5 *cm*, oben 7 *cm* und ist 3 *cm* hoch. Der Stopfen O_1 mißt unten 2·5 *cm*, oben 3·5 *cm* und ist ebenfalls 3 *cm* hoch. Beide Stöpsel tragen einen Glasgriff.

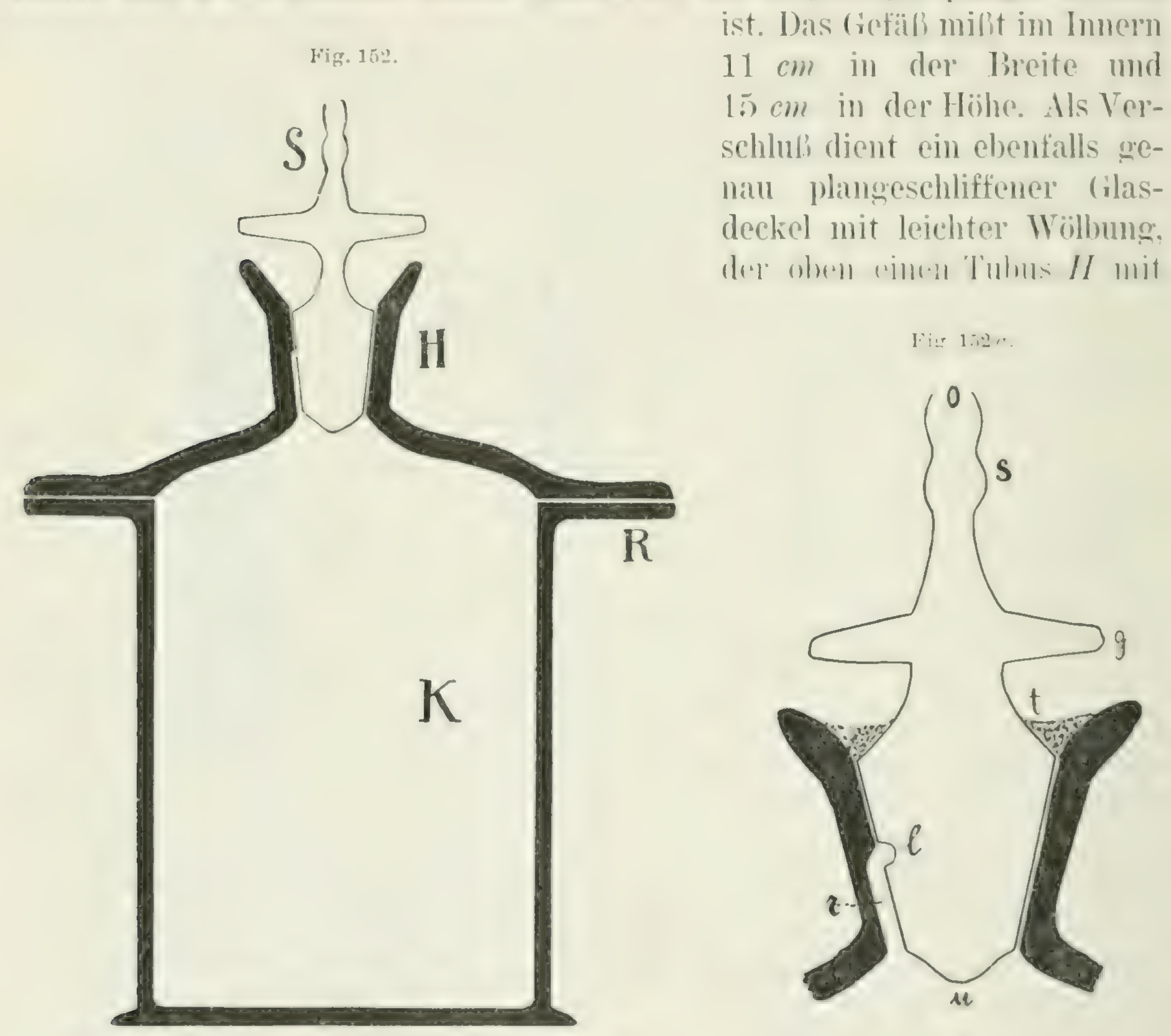
Fig. 151.



Diese Trockenröhre wird nun folgendermaßen beschickt: In den Schenkel *P* kommt eine Garnitur von 6—8 kleinen, 4 *cm* weiten Trichtern, deren Stengel etwa 3 *cm* messen. Sämtliche Trichterchen sind durch einen dickeren Eisendraht, der durch die Stengel hindurchgeht, verbunden. Um ein Abgleiten zu vermeiden, wird der Draht nach dem Einführen unten hakenförmig gekrümmt und oben zu einer Öse geformt. Auf die Trichterchen kommt dann Phosphorpentoxyd (P_2O_5), möglichst frei von P_4O_6. Sollte dieser stark flüchtige Körper als Verunreinigung vorhanden sein, so setzt man die beschickte Röhre einige Tage dem direkten Sonnenlichte aus, wodurch er unschädlich gemacht wird. Nach Einsetzen der Trichtergarnitur verschließt man diesen Schenkel mit dem gut durch Vaseline gefetteten Stopfen und vergießt den noch ober demselben freibleibenden Röhrenteil mit geschmolzener, nicht heißer, amerikanischer Vaseline. In das Rohr *S* kommen zuerst einige größere Bimssteinstücke und dann kleine,

die mit konzentrierter Schwefelsäure durchtränkt sind. Die überschüssige H_2SO_4 fließt in den Ansatz des Verbindungsrohres ab, weshalb man ohne weiteres mit Schwefelsäure die Bimssteinstücke nachfeuchten kann. Dann wird der Stopfen, wie früher angegeben, dicht aufgesetzt. Der Schlauchansatz des Schenkels *P* wird am besten mit einem festgekitteten Metallschlauch mit der Luftpumpe verbunden, während vom Ansatz des Schenkels *S* ein Druckschlauch zum Kulturgefäß führt.

Als „Kulturvakuum" dient ein zylindrisches Glasgefäß mit ebenem Boden und 4 *cm* breitem oberen Rand (*R*), der sorgfältigst plangeschliffen ist. Das Gefäß mißt im Innern 11 *cm* in der Breite und 15 *cm* in der Höhe. Als Verschluß dient ein ebenfalls genau plangeschliffener Glasdeckel mit leichter Wölbung, der oben einen Tubus *H* mit



eingesetztem Hahnstopfen *S* trägt. Fig. 152 zeigt uns das ganze Kulturvakuum, dessen Rauminhalt etwa 1400 cm^3 beträgt. Der Tubus des Deckels ist in seiner inneren Lichte nach oben auf 4 *cm* trichterförmig erweitert, so daß noch über der Hahnbasis eine Rinne *t* (vgl. Fig. 152 *a*) mit einer Tiefe von 1·3 *cm* verbleibt. Der ganze Hahnstopfen von *u* bis *o* mißt ungefähr 9·5 *cm*. Er besitzt oben den Schlauchansatz *s* von ca. 9 *mm* Durchmesser und davon abgehend geschlossen die beiden Handgriffe *g* von ca. 2 *cm* Länge. Der Hahn ist hohl und hat eine Schlifffläche von 2·5 *cm* Breite. In der Mitte der letzteren ist eine Bohrung *l* angebracht, die mit einer Rinne *r* der Schlifffläche des Tubus korrespondiert. Diese Rinne läuft senkrecht nach unten,

wie aus der Fig. 152 *a* ohne Schwierigkeit zu entnehmen ist. Infolge dieser sinnreichen Konstruktion ist eine ausgezeichnete Dichtung des Apparates verbürgt. Das untere Ende des Hahnbolzens darf nicht über die Konkavität

Fig. 153.

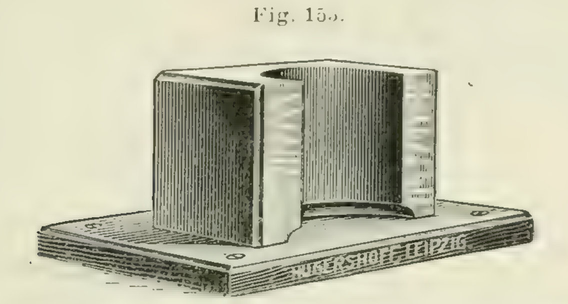


Fig. 154.



des Deckels hervorragen, damit beim Abziehen desselben ein Zerbrechen des Hahnes sicher vermieden ist.

Als Dichtungsmittel für die Schliffflächen empfiehlt *Arthur Meyer* beim Gebrauch des Apparates in Temperaturen unter 28° C wasserfreies Lanolin (Adeps lanae puriss. anhydric. T. 38—40° C). Für höhere Temperaturen benutzt *Meyer* ein geschmolzenes Gemisch von 40 *g* Wollfett und 30 *g* Karnaubawachs. Damit werden die Schliffe eingefettet und die Masse durch Drehen und Drücken der aufgepaßten Schliffteile dazwischen gleichmäßig blasenfrei verteilt. Zur Sicherung des Verschlusses zwischen Hahnbolzen und Tubus wird die Rinne *t* noch mit frischgeschmolzenem Lanolin vergossen.

Zur Erleichterung des Abhebens des Deckels vom Kulturvakuum dient der in Fig. 153 abgebildete Holzblock, wie ihn *Bredemann* (l. c.) angibt. In diesen wird das Kulturvakuum eingeschoben und dann der Deckel, mit der flachen Hand gehalten, seitlich wagrecht abgeschoben. Nötigenfalls wärmt man den Deckelrand vorsichtig mit der Bunsenflamme an.

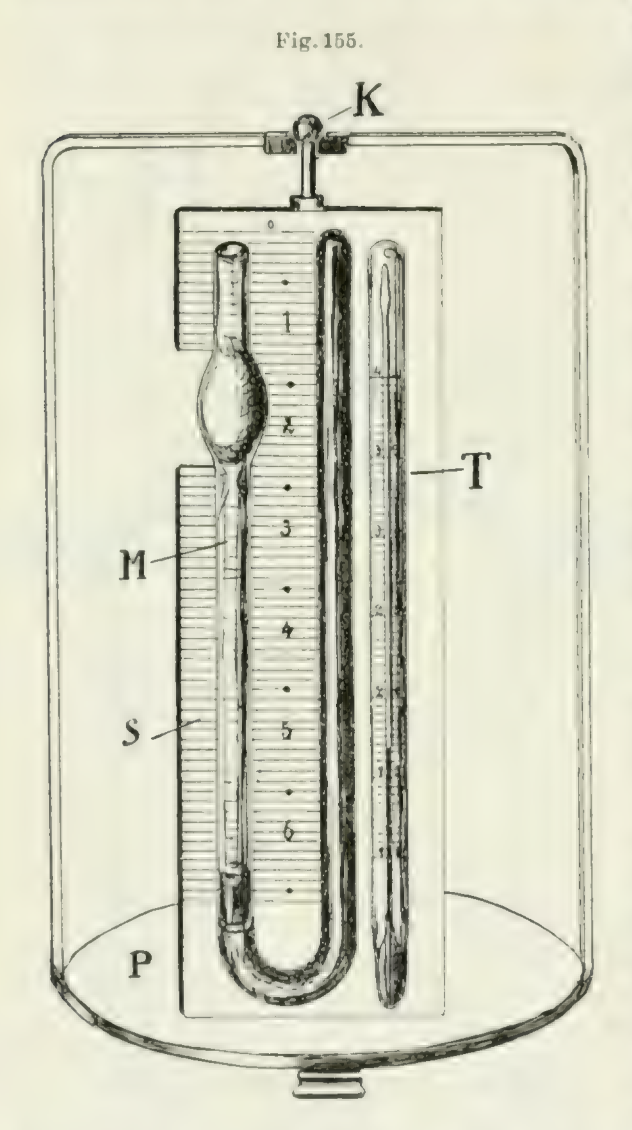
Zum Messen der im Kulturvakuum herrschenden Drucke unter 95 *mm* Quecksilber dient das

Kulturmanometer A. Meyers.

Dasselbe ist unmittelbar an dem Kulturschalenträger mit einer Kugelaufhängevorrichtung angebracht, so daß es sich von selbst immer senkrecht einstellen muß. Fig. 154 zeigt uns das einseitig geschlossene Manometerrohr nach einer Abbildung aus *Meyers* Beschreibung in natürlicher Größe. Dasselbe ist 120 *mm* lang und besitzt eine innere Lichte von

5 *mm*, die an den für die Messung bestimmten Teilen genau eingehalten ist. Der offene Schenkel besitzt bei *K* eine kugelförmige Erweiterung, die sich nach unten in eine Verengung *(j)* von etwa 1·5 *mm* innerem Durchmesser fortsetzt. „15 *mm* vom untersten, äußersten Punkte der gebogenen Stelle des Rohres entfernt ist im offenen Schenkel eine nach oben offene 6 *mm* lange Spitze *(s)* zum Abfangen der Luftblasen eingeschmolzen." Das Manometer wird bis 4 *mm* über die genannte Spitze mit reinstem, trockenem Quecksilber gefüllt. In die kugelige Erweiterung *K* kommt zuerst ein wenig Baumwolle, dann ein Gemenge von Watte und echtem Rauschgold, um austretende Quecksilberdämpfe zu absorbieren.

Fig. 155.



Das Manometer ist an einer vernickelten oder besser vergoldeten Skala angebracht, die eine durchgehende Millimeterteilung trägt. *Meyer* ließ zum leichteren Ablesen je 5 *mm* durch Punkte markieren und von 10 zu 10 *mm* beiderseits Zahlen einschlagen. An der Manometerskala ist noch ein in halbe Grade geteiltes Thermometer angebracht, dessen Meßbereich zwischen + 12 und + 45° C liegt.

Fig. 155 stellt die Kulturschale mit dem daran aufgehängten Kulturmanometer dar. Bei *K* ist letzteres in einer konischen Bohrung mit einer Kugel aufgehängt. *M* entspricht dem Manometerrohr, während *S* die Skala ist. An ihr befestigt ist noch das Thermometer *T*. Das Manometer ist, wie ersichtlich, fertig gefüllt und enthält in der Erweiterung bereits die mit Schaumgold gemischte Watte.

Um nun auch Drucke über 95 *mm* Hg messen zu können, bedient man sich eines Quecksilbermanometers, das *Arthur Meyer*[1]) für die Messung der hohen Sauerstoffkonzentrationen unter Überdruck benutzt. Man schaltet dann nur ein T-Stück zwischen Kulturvakuumgefäß und Manometer, wie

[1]) *Arthur Meyer*, Apparat für die Kultur von Bakterien bei hohen Sauerstoffkonzentrationen, sowie zur Bestimmung der Sauerstoffmaxima der Bakterienspezies und der Tötungszeiten bei höheren Sauerstoffkonzentrationen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 16. 1906. S. 392.

es *Bredemann* (l. c.) angibt. Vorerst sei das Manometer kurz beschrieben. Dieser Druckmeßapparat besteht aus einem Heberbarometer und einem offenen Manometer. In der Fig. 156 bedeutet *B* das Barometer und *M* das Manometer. Beide sind auf ein Brett von 1004 *cm* Höhe aufgemacht. Das vertikale Brett ruht auf einem Grundbrett mit Stellschrauben, um den Apparat lotrecht einstellen zu können. Die Röhren sind mit Milchglasplatten hinterkleidet. Das Barometer trägt eine Halbmillimeterteilung, die korrespondierend vorne und hinten angebracht ist, was die richtige Ablesung sehr erleichtert. Das Manometer trägt eine gleiche Einmillimeterteilung. Beide Röhren haben ihren Nullpunkt unten am Ende der Milchglasplatten. Die Skala erstreckt sich über 90 *cm*. Der rechte Manometerschenkel trägt oben eine seitlich gekehrte kugelige Erweiterung, von der eine Spitze mit $^1/_2$ *mm* Bohrung in das Rohr hineinragt. Diese Erweiterung ist mit einem Gemisch von Watte und echtem Blattgold angefüllt. Der rechte Schenkel mündet in die entsprechende Bohrung eines Metallstückes, in das er luftdicht eingekittet ist. Mit einer Holländerverschraubung wird dann der Druckschlauch angelegt. Dieser führt nun zu dem schon früher genannten **T**-Stück. Dasselbe ist in Fig. 157 abge-

Fig. 156.

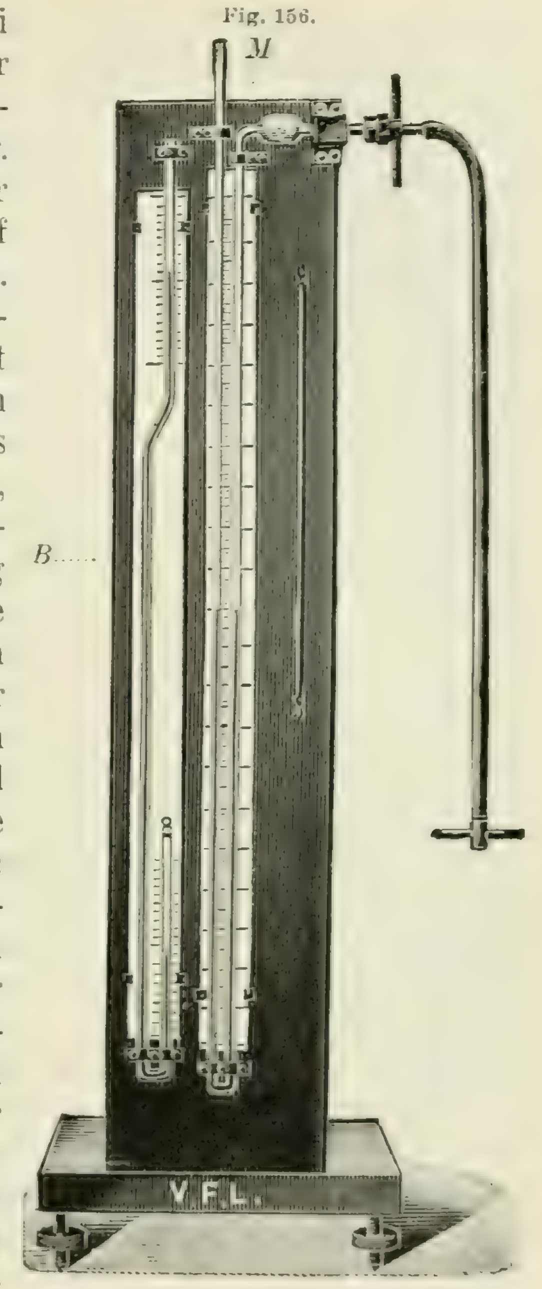
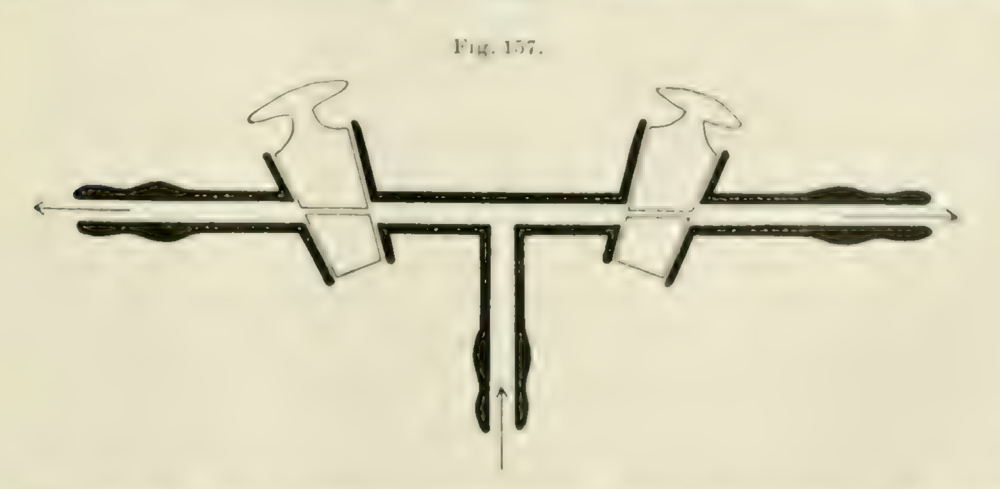


Fig. 157.



bildet. Es hat an den beiden horizontalen Schenkeln einen sehr gut geschliffenen Glashahn, an den sich die Schlauchansätze anschließen. Der

senkrechte Schenkel wird mit dem Schlauchansatz des Kulturvakuums *(s)* durch einen guten Druckschlauch verbunden. Alle drei Hähne werden nun geöffnet und je ein horizontaler Schlauchansatz mit der Luftpumpe und mit dem Quecksilbermanometer verbunden. Nun pumpt man bis zum gewünschten Manometerstand aus. Jetzt schließt man zuerst den Hahn des Kulturvakuums, dann die beiden anderen Hähne und nimmt Manometer und Pumpe ab.

„Man hat, wenn man in dieser Weise verfährt, allerdings keine andauernde Kontrolle über den im Kulturvakuum herrschenden Druck, wie das bei der Benutzung des Kulturmanometers, welcher sich im Kulturvakuum selbst befindet, der Fall ist, doch läßt sich der Druck jederzeit leicht kontrollieren. Zu diesem Zwecke setzt man das System Kulturvakuum, T-Rohr, Manometer und Luftpumpe wieder zusammen, öffnet nur die T-Rohrhähne und evakuiert, bis das Manometer den zu kontrollienden Stand anzeigt, dann erst öffnet man den Hahn des Kulturvakuums, es muß nun natürlich, wenn der Druck unverändert geblieben ist, auch der Quecksilberstand des Manometers unverändert bleiben.“ [1])

Die Zucht mit dieser Apparatur wird nun folgendermaßen ausgeführt:

Das unmittelbar vor dem Gebrauch sehr gut ausgekochte Nährsubstrat wird möglichst rasch zu Platten verarbeitet, die dann nach dem Erstarren sofort in den Schalenträger eingestellt werden. Hierauf wird maximal evakuiert. Soll jedwede Spur von Sauerstoff entfernt werden, so stellt man noch eine Schale mit alkalischer Pyrogallollösung ein. (Siehe d. Handbuch, Bd. IV, S. 1245, wo die am besten O absorbierenden Gemische angegeben sind. In diesem Falle verwendet man sofort die Lösung, da ja nachherige Wasserauffüllung ausgeschlossen ist.) Um einen wasserdampfgesättigten Raum zu haben, gießt man vorher in das Vakuumgefäß ein wenig Wasser. Die verwendeten Petrischalen sollen einen Durchmesser von 70 *mm* haben. Man kann auch an Stelle einer Pyrogallollösung die Durchspülung des Vakuums mit Wasserdampf anwenden, um den Sauerstoff zu verdrängen. In diesem Falle gießt man etwas mehr Wasser ein und erwärmt das Kulturvakuum auf ca. 26° C, dann evakuiert man längere Zeit, wobei das Wasser im Sieden bleibt. Man muß dabei den ganzen Apparat bei dieser Temperatur halten. Außerdem ist es zweckmäßig, in diesem Falle einen Schwefelsäureturm zwischen Kulturgefäß und Trockenröhre noch einzuschalten, um in letztere möglichst wenig Wasserdampf zu bekommen.

Viel wichtiger noch ist der *Mayer*sche Apparat aber für die Züchtung in einer Atmosphäre von bestimmtem Sauerstoffgehalt. Um nun zu möglichst genauen Ergebnissen zu gelangen, ist es notwendig, in erster Linie den Nährboden so luftfrei als möglich zu haben. Bekanntlich enthalten die an der Luft stehenden Gallerten, Agar, Gelatine und alle flüssigen Nährsubstrate ziemlich beträchtliche Mengen Luft, also auch Sauerstoff, die sich unter der Luftpumpe nicht so leicht ohne weiteres entfernen

[1]) Zitiert *Bredemann*, Zentralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 23. 1909. S. 413, 414.

lassen. Nach *Bredemann* (l. c.) verfährt man bei festen Nährsubstraten in der Weise, daß man sie schon vor der Verimpfung im Vakuum mit einer Leuchtbakterienkultur einige Wochen hält, aus deren Erlöschen der Mangel jedweden Sauerstoffes erschlossen werden kann. Die Gallertnährböden werden $^1/_2$ Stunde im strömenden Dampf erhitzt und dann rasch, womöglich auf Eis erstarren gelassen. Hierauf bringt man die Röhrchen sofort mit einer frischen Leuchtbakterienkultur in das Kulturvakuum, das am Boden mit Wasser beschickt ist. Jetzt wird sofort möglichst weit evakuiert. Flüssige Nährböden werden gleich behandelt, nur geht es bei ihnen schneller, weil man sie durch geringes Erwärmen mit dem Vakuumapparat im sehr luftverdünnten Raum auskochen kann. Dabei ist nur darauf zu achten, daß sie nicht durch zu starkes Schäumen die Wattebäusche benetzen. Unmittelbar vor der Verimpfung werden die Röhrchen erst aus dem Vakuum entfernt, rasch infiziert und sofort in die gewünschte Sauerstoffatmosphäre gebracht.

Bestimmung des Sauerstoffgehaltes und der Größe der Evakuierung bei Verwendung des Kulturmanometers.

Nachdem wir jederzeit den Druck und die Temperatur im Kulturraum bestimmen können, sind wir in der Lage, auch den Sauerstoffgehalt im Liter Kulturvakuum zu berechnen. *Arthur Meyer* (l. c.) gibt dafür die Formeln an. Für die Bestimmung ist besonders eine genaue Ablesung des Druckes und der Temperatur im Kulturvakuum erforderlich. Zur Lösung der Frage, wieviel Sauerstoff in einem Liter verdünnter Luft des Kulturraumes von einem bestimmten Druck (p) in Millimetern Quecksilber und einer bestimmten Temperatur (t) vorhanden sind, müssen wir nach *Arthur Meyer* (l. c.) folgende Zahlen kennen:

den Gehalt der Luft an Sauerstoff in Volumprozenten = 20·9
das Gewicht von 1 *l* O bei 0° und 760 *mm* Quecksilberdruck in Grammen für die geographische Breite von 45° = 1·4292
die Tension des gesättigten Wasserdampfes bei der Temperatur t, ausgedrückt in Quecksilberhöhen bei 0° und in 45° geographischer Breite und am Meeresspiegel . . . . = e
die Temperatur der Atmosphäre im Kulturvakuum während der Druckablesung . . . . = t
den Druck in Millimetern Quecksilber der Atmosphäre im Kulturraum . . . . = p
den absoluten Nullpunkt . . . . = 273°

Die Formel lautet für die Bestimmung von Sauerstoff in Grammen =

$$\frac{20{\cdot}9}{100} \cdot \frac{273 + 0}{273 + t} \cdot \frac{p - e \text{ (bei } t^0)}{760} \cdot 1{\cdot}429,$$

wenn es sich um einen wasserdampfgesättigten Raum handelt.

Sobald man aber an Stelle des Wassers eine Kalilauge einfüllt, was für die Absorption entstehender Kohlensäure mitunter notwendig ist, dann

muß in obige Formel für e die Tension von Wasserdampf aus Kalilauge (k) eingesetzt werden.

Die Formel lautet dann $\frac{20\cdot9}{100} \cdot \frac{273 + 0}{273 + t} \cdot \frac{p - k\,(\text{bei } t^0)}{760} \cdot 1\cdot429.$

Meistens verfolgt man den Zweck, in einer ganz bestimmten Sauerstoffmenge im Liter züchten zu können und muß dann natürlich wissen, bis zu welchem Druck (p) man zu evakuieren hat, um denselben bei der bestimmten Temperatur zu erhalten. Da gilt die Formel (*Arthur Meyer*, 1906)

$$p = e \text{ (oder k) (bei } t^0) + \frac{(g \,.\, 100 \,.\, 760) \,.\, (273 + t)}{1\cdot429 \,.\, 20\cdot9 \,.\, 273},$$

worin g den Gehalt an Sauerstoff, in *mg* ausgedrückt, im Liter des Gasgemisches bedeutet.

Zur rascheren Berechnung seien hier 2 Tabellen über die Tension des Wasserdampfes über Wasser und die Tension des Wasserdampfes aus Lösungen von Kaliumhydroxyd bei verschiedenen Temperaturen angeführt.

Tabelle I.

Tension des Wasserdampfes über Wasser.

(Aus *Landolt-Börnstein*, Physikalisch-chemische Tabellen, 1905.)

Temperatur C⁰	*mm*	Temperatur C⁰	*mm*
15	12·728	26	24·987
16	13·565	27	26·505
17	14·450	28	28·103
18	15·383	29	29·785
19	16·367	30	31·555
20	17·406	31	33·416
21	18·503	32	35·372
22	19·661	33	37·427
23	20·883	34	39·586
24	22·178	35	41·853
25	23·546	36	44·230

In der folgenden Tabelle III (S. 602), die von *Bredemann* (l. c.) berechnet ist, sind diejenigen Drucke p in Millimetern angegeben, bis zu denen bei den Temperaturen von 15—36° C (t) zu evakuieren ist, wenn im absolut trockenen Kulturvakuum (A) oder im Wasserdampf gesättigten Kulturraum (B) ein Sauerstoffgehalt von 0·1—25 *mg* (g) im Liter vorhanden sein soll.

Befindet sich aber eine Auflösung von KOH im Kulturvakuum, so müssen die entsprechenden Tensionen aus Tabelle II den Werten der Tabelle IIIA zugezählt werden. Als Beispiel diene folgendes:

Um einen Sauerstoffgehalt von 0·2 *mg* im Liter bei 16° C über 23·08%iger KOH-Lösung in Wasser im Kulturvakuum zu haben, muß also ausgepumpt werden bis zum Druck

$$0\cdot539 + 10\cdot82 = \mathbf{11\cdot359}\ mm.$$

Wenn andere Lösungen eingestellt werden, muß deren Tension nachgesehen und ebenfalls addiert werden.

Tabelle II.

Tension des Wasserdampfes aus Lösungen von KOH.

(Entnommen aus *Bredemann,* Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 23. 1911. S. 415.)

Temperatur Grad C	10 KOH + 100 H_2O — 9·09% KOH	20 KOH + 100 H_2O — 16·66% KOH	30 KOH + 100 H_2O — 23·08% KOH	Temperatur Grad C	10 KOH + 100 H_2O — 9·09% KOH	20 KOH + 100 H_2O — 16·66% KOH	30 KOH + 100 H_2O — 23·08% KOH
	Millimeter				Millimeter		
10·00	8·62	8·01	7·31	22·50	19·09	16·25	14·47
10·50	8·91	8·28	7·56	23·00	19·68	16·75	14·92
11·00	9·21	8·56	7·82	23·65	20·47	17·43	15·52
11·70	9·64	8·97	8·19	24·00	20·92	17·80	15·86
12·10	9·90	9·21	8·41	24·50	21·54	18·35	16·35
12·50	10·16	9·46	8·63	25·00	22·19	18·91	16·85
13·00	10·50	9·77	8·92	25·50	22·90	19·52	17·40
13·50	10·85	10·09	9·22	26·00	23·55	20·07	17·89
13·95	11·17	10·39	9·49	26·50	24·26	20·68	18·43
14·50	11·57	10·77	9·83	26·98	24·95	21·27	18·96
15·15	12·06	11·22	10·25	27·50	25·73	21·94	19·57
15·30	12·18	11·33	10·35	27·93	26·38	22·51	20·07
16·00	12·74	11·85	10·82	28·60	27·44	23·41	20·89
16·35	13·03	12·12	11·07	29·00	28·08	23·96	21·38
17·00	13·57	12·63	11·54	29·50	28·91	24·67	22·02
17·50	14·01	13·04	11·91	30·00	29·76	25·40	22·67
18·00	14·46	13·45	12·29	30·65	30·89	26·37	23·54
18·50	14·92	13·88	12·69	31·00	31·51	26·91	24·03
19·00	15·39	14·33	13·09	31·50	32·42	27·70	24·73
19·40	15·78	14·68	13·41	32·13	33·61	28·72	25·65
20·00	16·38	15·25	13·93	32·50	34·32	29·33	26·21
20·25	16·63	15·48	14·15	33·00	35·30	30·18	26·95
21·00	17·42	16·22	14·82	33·50	36·31	31·05	27·76
21·50	17·96	16·72	15·29	34·00	37·34	31·94	28·56
21·82	18·32	17·06	15·59	34·50	38·40	32·86	29·38

Bestimmung des Sauerstoffgehaltes bei Anwendung des Quecksilbermanometers (S. 597).

Bei dieser Bestimmung ist natürlich der Barometerstand mit in Rechnung zu ziehen. Sie erfolgt nach *Arthur Meyer*[1]) und *G. Bredemann*[2]) nach Ablesung folgender Daten:

1. „Die Höhe der Quecksilbersäule des Barometers = b (also die am langen Schenkel abgelesene Zahl in *mm* (l), weniger der abgelesenen Zahl am kurzen Schenkel (k); l — k = b).

2. Die Höhe der Quecksilbersäule des Manometers = m.“

[1]) *Arthur Meyer,* Apparat für die Kultur von Bakterien bei hohen Sauerstoffkonzentrationen etc. Zentralblatt f. Bakt. II. Abt. Bd. 16. 1906. S. 395.

[2]) *G. Bredemann,* Bacillus amylobacter A. M. et Bredemann, Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 23. 1909. S. 418.

Tabelle

A. Druckhöhen (p), bis zu welchen zu evakuieren ist, wenn im absolut trockenen Kulturraum

Temperatur Grad C	g = 0·1 mg	g = 0·2 mg	g = 0·3 mg	g = 0·4 mg	g = 0·5 mg	g = 0·6 mg	g = 0·7 mg	g = 0·8 mg	g = 0·9 mg	g = 1·0 mg	g = 2·0 mg
	p = mm										
15	0·268	0·537	0·805	1·074	1·342	1·611	1·879	2·148	2·416	2·684	5·369
16	0·269	0·539	0·808	1·078	1·347	1·616	1·886	2·156	2·424	2·694	5·388
17	0·270	0·541	0·811	1·081	1·352	1·622	1·892	2·163	2·433	2·703	5·406
18	0·271	0·543	0·814	1·085	1 356	1·627	1·899	2·170	3·441	2·712	5·425
19	0·272	0·544	0·817	1·089	1·361	1·633	1·905	2·178	2·450	2·721	5·443
20	0·273	0·546	0 819	1·093	1·366	1·639	1·912	2·186	2·458	2·731	5·464
21	0·274	0·548	0 822	1·096	1·370	1·644	1·918	2·193	2·466	2·741	5·482
22	0·275	0·550	0·825	1·100	1·375	1·650	1·925	2·200	2·475	2·750	5 500
23	0·276	0·552	0·828	1·104	1·380	1·655	1·931	2·208	2·483	2·759	5·518
24	0·277	0·554	0·831	1·107	1·384	1·661	1·938	2·215	2·492	2·768	5·537
25	0·278	0·556	0·833	1·111	1·389	1·667	1·944	2·222	2·500	2·777	5·555
26	0·279	0·557	0·836	1·115	1·394	1·672	1·951	2·230	2·508	2·788	5·573
27	0·280	0·559	0·839	1·118	1·398	1·678	1·957	2·237	2·516	2·797	5·593
28	0·281	0·561	0·842	1·122	1·403	1.683	1·964	2·244	2·525	2·806	5·611
29	0·281	0·563	0·845	1·126	1·408	1·689	1·971	2·252	2·533	2·815	5·630
30	0·282	0·565	0·847	1·130	1·412	1·695	1·977	2·260	2·542	2·824	5·649
31	0·283	0·567	0·850	1·134	1·417	1·700	1·984	2·268	2·550	2·834	5·667
32	0·284	0·569	0·853	1·137	1·421	1·706	1·990	2·275	2.559	2·843	5·686
33	0·285	0·571	0·856	1·141	1·426	1·711	1·997	2·282	2·567	2·852	5·705
34	0·286	0·572	0·858	1·144	1·431	1·717	2·003	2·289	2·575	2·862	5·723
35	0·287	0·574	0·861	1·148	1·435	1·723	2·010	2·296	2·584	2·871	5·742
36	2·288	0·576	0·864	1·152	1·440	1·728	2·016	2·304	2·592	2·880	5·761

B. Druckhöhen (p), bis zu welchen zu evakuieren ist, wenn in den wasserdampfgesättigten Kultur-

Temperatur Grad C	g = 0·1 mg	g = 0·2 mg	g = 0·3 mg	g = 0·4 mg	g = 0·5 mg	g = 0 6 mg	g = 0·7 mg	g = 0·8 mg	g = 0·9 mg	g = 1·0 mg	g = 2·0 mg
	p = mm										
15	13·0	13·3	13·5	13·8	14·1	14·3	14·6	14·9	15·1	15·4	18·1
15·5	13·4	13·7	14·0	14·2	14·5	14·8	15·1	15·3	15·6	15·9	18·6
16·0	13·8	14·1	14·4	14·6	14·9	15·2	15·5	15·7	16·0	16·3	19·0
16·5	14·3	14·6	14·9	15·1	15·4	15·7	15·9	16·2	16·5	16·8	19·5
17·0	14·7	15·0	15·3	15·5	15·8	16·1	16·3	16·6	16·9	17·2	19·9
17·5	15·2	15·4	15·8	16·0	16·3	16·6	16·8	17·1	17·4	17·7	20·3
18·0	15·7	15·9	16·2	16·5	16·7	17·0	17·3	17·6	17·8	18·1	20·8
18·5	16·2	16·4	16·7	17·0	17·2	17·5	17·8	18·1	18·3	18·6	21·3
19·0	16·6	16·9	17·2	17·5	17·7	18·0	18·3	18·5	18·8	19·1	21·9
19·5	17·1	17·4	17·7	18·0	18·2	18·5	18·8	19·0	19·3	19·6	22·3
20·0	17·7	17·9	18·2	18·5	18·8	19·1	19·3	19·6	19·9	20·1	22·8
20·5	18·2	18·5	18·7	19·0	19·3	19·6	19·8	20·1	20·4	20·6	23·4
21·0	18·8	19·1	19·3	19·6	19·9	20·1	20·4	20·7	21·0	21·2	24·0
21·5	19·3	19·6	19·6	20·2	20·4	20·7	21·0	21·3	21·6	21·8	24·6
22·0	19·9	20·2	20·5	20·8	21·0	21·3	21·6	21·9	22·1	22·4	25·2
22·5	20·5	20·7	21·1	21·4	21·6	21·9	22·2	22·5	22·7	23·0	25·8
23·0	21·1	21·4	21·7	22·0	22·3	22·5	22·9	23·1	23·4	23·6	26·4
23·5	21·8	22·0	22·3	22·6	23·0	23·2	23·5	23·7	24·0	24·3	27·0
24·0	22·5	22·7	23·0	23·3	23·6	23·9	24·1	24·4	24·7	25·0	27·7
24·5	23·2	23·4	23·7	24·0	24·2	24·5	24·8	25·1	25·4	25·7	28·4
25·0	23·8	24·1	24·4	24·7	24·9	25·2	25·5	25·8	26·1	26·3	29·1
25·5	24·6	24·8	25·1	25·4	25·7	25·9	26·2	26·5	26·7	27·0	29·8
26·0	25·3	25·5	25·8	26·1	26·4	26·7	26·9	27·2	27·5	27·8	30·6
26·5	26·0	26·3	26·5	26·8	27·1	27·4	27·7	28·0	28·2	28·5	31·3
27·0	26·8	27·1	27·3	27·6	27·9	28·2	28·5	28·7	29·0	29 3	32·1
27·5	27·6	27·9	28·1	28·4	28·7	29·0	29·3	29·5	29·8	30·1	32·9
28·0	28·4	28·7	29·0	29·2	29·5	29·8	30·1	30·3	30·6	30·9	33·7
28·5	29·2	29·5	29·8	30·0	30·3	30·6	30·9	31·1	31·4	31·7	34·5
29·0	30·1	30·4	30·6	30·9	31·2	31·5	31·8	32·0	32·3	32·6	35·4

III.

bei den angegebenen Temperaturen ein O-Gehalt (g) von 0·1—25 *mg* im Liter vorhanden sein soll.

g = 3·0 *mg*	g = 4·0 *mg*	g = 5·0 *mg*	g = 6·0 *mg*	g = 7·0 *mg*	g = 8·0 *mg*	g = 9·0 *mg*	g = 10·0 *mg*	g = 15·0 *mg*	g = 20·0 *mg*	g = 25·0 *mg*	Temperatur Grad C
p = *mm*											
8·053	10·74	13·42	16·11	18·79	21·48	24·16	26·84	40·27	53·69	67·12	15
8·081	10·78	13·47	16·16	18·86	21·56	24·24	26·94	40·41	53·88	67·35	16
8·109	10·81	13·52	16·22	18·92	21·63	24·33	27·03	40·55	54·06	67·58	17
8·137	10·85	13·56	16·27	18·99	21·70	24·41	27·12	40·69	54·25	67·81	18
8·165	10·89	13·61	16·33	19·05	21·78	24·50	27·21	40·83	54·44	68·04	19
8·193	10·93	13·66	16·39	19·12	21·86	24·58	27·31	40·97	54·63	68·27	20
9·221	10·96	13·70	16·44	19·18	21·93	24·66	27·41	41·11	54·82	68·51	21
8·249	11·00	13·75	16·50	19·25	22·00	24·75	27·50	41·25	55·00	68·74	22
8·277	11·04	13·80	16·55	19·31	22·08	24·83	27·59	41·39	55·18	68·98	23
8·305	11·07	13·84	16·61	19·38	22·15	24·92	27·68	41·53	55·37	69·21	24
8·333	11·11	13·89	16·67	19·44	22·22	25·00	27·77	41·67	55·55	69·44	25
8·361	11·15	13·94	16·72	19·51	22·30	25·08	27·87	41·81	55·73	69·67	26
8·389	11·18	13·98	16·78	19·57	22·37	25·16	27·96	41·95	55·93	69·91	27
8·417	11·22	14·03	16·83	19·64	22·44	25·25	28·06	42·08	56·11	70·14	28
8·445	11·26	14·08	16·89	19·71	22·52	25·33	28·15	42·22	56·30	70·38	29
8·473	11·30	14·12	16·95	19·77	22·60	25·42	28·24	42·36	56·49	70·61	30
8·501	11·34	14·17	17·00	19·84	22·68	25·50	28·34	42·50	56·67	70·85	31
8·528	11·37	14·21	17·06	19·90	22·75	25·59	28·43	42·64	56·86	71·08	32
8·558	11·41	14·26	17·11	19·97	22·82	25·67	28·52	42·78	57·05	71·31	33
8·585	11·44	14·31	17·17	20·03	22·89	25·75	28·62	42·92	57·23	71·54	34
8·613	11·48	14·35	17·23	20·10	22·96	25·84	28·71	43·06	57·42	71·77	35
8·641	11·52	14·40	17·28	20·16	23·04	25·92	28·80	43·20	57·61	72·01	36

raum bei den angegebenen Temperaturen ein O-Gehalt (g) von 0·1—25 *mg* im Liter vorhanden sein soll.

g = 3·0 *mg*	g = 4·0 *mg*	g = 5·0 *mg*	g = 6·0 *mg*	g = 7·0 *mg*	g = 8·0 *mg*	g = 9·0 *mg*	g = 10·0 *mg*	g = 15 0 *mg*	g = 20·0 *mg*	g = 25·0 *mg*	Temperatur Grad C
p = *mm*											
20·8	23·5	26·2	28·8	31·5	34·2	36·9	39·6	53·0	66·5	79·9	15·0
21·3	24·0	26·6	29·2	32·0	34·7	37·4	40·1	53·5	67·0	80·4	15·5
21·7	24·4	27·0	29·7	32·4	35·1	37·8	40·5	54·0	67·5	80·9	16·0
22·2	24·9	27·5	30·2	32·9	35·6	38·3	41·0	54·5	68·0	81·4	16·5
22·6	25·3	28·0	30·7	33·4	36·1	38·8	41·5	55·0	68·5	82·0	17·0
23·1	25·8	28·4	31·2	33·9	36·6	39·3	42·0	55·5	69·0	82·6	17·5
23·5	26·2	28·9	31·7	34·4	37·1	39·8	42·5	56·1	69·6	83·2	18·0
24·0	26·7	29·4	32·2	34·9	37·6	40·3	43·0	56·6	70·2	83·8	18·5
24·5	27·3	30·0	32·7	35·4	38·2	40·9	43·6	57·2	70·8	84·4	19·0
25·0	27·8	30·5	33·2	35·9	38·7	41·4	44·1	57·8	71·4	85·1	19·5
25·6	28·3	31·1	33·8	36·5	39·2	42·0	44·7	58·4	72·0	85·7	20·0
26·1	28·9	31·6	34·3	37·1	39·8	42·6	45·3	59·0	72·6	86·2	20·5
26·7	29·5	32·2	34·9	37·7	40·4	43·2	45·9	59·6	73·3	87·0	21·0
27·3	30·1	32·8	35·5	38·3	41·0	43·8	46·5	60·2	74·0	87·7	21·5
27·9	30·7	33·4	36·2	38·9	41·7	44·4	47·2	60·9	74·7	88·4	22·0
28·5	31·3	34·0	36·8	39·5	42·3	45·0	47·8	61·6	75·4	89·1	22·5
29·2	31·9	34·7	37·4	40·2	43·0	45·7	48·5	62·3	76·1	89·9	23·0
29·8	32·6	35·4	38·1	40·9	43·7	46·4	49·2	63·0	76·8	90·6	23·5
30·5	33·3	36·0	38·8	41·6	44·3	47·1	49·9	63·7	77·6	91·4	24·0
31·2	34·0	36·7	39·5	42·3	45·0	47·8	50·7	64·4	78·4	92·2	24·5
31·9	34·7	37·4	40·2	43·0	45·8	48·6	51·3	65·2	79·1	92·9	25·0
32·6	35·5	38·2	41·0	43·8	46·6	49·4	52·1	65·9	79·9	93·8	25·5
33·5	36·1	38·9	41·7	44·5	47·3	50·1	52·9	66·8	80·7	94·7	26·0
34·2	36·9	39·7	42·0	45·3	48·1	50·9	53·7	67·6	81·5	95·5	26·5
34·9	37·7	40·5	43·3	46·1	48·9	51·7	54·5	68·5	82·4	96·4	27·0
35·7	38·5	41·3	44·1	46·9	49·7	52·5	55·3	69·3	83·3	97·3	27·5
36·5	39·3	42·1	44·9	47·7	50·5	53·4	56·2	70·2	84·2	98·2	28·0
37·3	40·2	43·0	45·8	48·6	51·4	54·3	57·1	71·1	85·1	99·2	28·5
38·2	41·1	43·9	46·7	49·5	52·3	55·1	57·9	72·0	86·1	100·2	29·0

Tabelle IV.

Manometerstand *mm*	Barometerstand *mm*	15°	16°	17°	18°	19°	20°	21°	22°	23°	24°	25°	26°	27°	28°	29°	30°
		Sauerstoff *mg*															
95 (= 7/8 Atmosph.)	760	239	237	236	235	233	232	230	228	227	225	223	222	220	218	216	214
	750	242	241	239	238	236	235	233	231	230	229	227	225	223	221	219	218
	740	245	244	242	241	240	238	236	235	233	231	230	228	226	224	222	220
190 (= 3/4 Atmosph.)	760	205	203	202	201	200	199	197	196	194	193	191	190	188	186	185	184
	750	208	206	205	204	202	201	200	198	197	196	194	193	191	189	188	187
	740	210	209	208	206	205	204	203	201	200	198	197	195	194	192	191	189
285 (= 5/8 Atmosph.)	760	171	170	169	168	167	165	164	163	162	161	160	158	157	156	155	153
	750	173	172	171	170	169	168	167	165	164	163	162	161	159	158	157	155
	740	175	174	173	172	171	170	169	168	167	165	164	163	162	160	159	157
380 (= 1/2 Atmosph.)	760	137	136	135	134	133	132	131	131	130	129	128	127	126	125	124	123
	750	138	137	137	136	135	134	133	132	131	131	129	128	127	126	125	124
	740	140	139	138	138	137	136	135	134	133	132	131	130	129	128	127	126
475 (= 3/8 Atmosph.)	760	102	102	101	101	100	99	99	98	97	97	96	95	94	94	93	92
	750	104	103	103	102	101	101	100	99	99	98	97	96	96	95	94	93
	740	105	105	104	103	103	102	101	101	100	99	98	98	97	96	95	94
570 (= 1/4 Atmosph.)	760	68	68	67	67	66	66	65	65	64	64	63	63	62	62	62	61
	750	69	69	68	68	67	67	67	66	66	65	65	64	64	63	63	62
	740	70	70	69	69	68	68	68	67	67	66	66	65	65	64	64	63
665 (= 1/8 Atmosph.)	760	34	34	34	34	33	33	33	33	32	32	32	32	31	31	31	31
	750	35	34	34	34	34	34	33	33	33	33	33	32	32	32	31	31
	740	35	35	35	34	34	34	34	34	33	33	33	33	32	32	32	31

3. Die Temperatur der Quecksilbersäule und der Luft im Kulturvakuum = t (Ablesung nach längerem Aufenthalt der Zusammenstellung im Arbeitsraum).

Die Höhe der Quecksilbersäule p^t, die dem negativen Druck im Kulturraum entspricht, wird erhalten durch Subtraktion der Höhe m der Quecksilbersäule des Manometers vom Barometerstand b.

$$p^t = b - m.$$

Diese wirkliche Länge der Quecksilbersäule muß auf die Länge der Säule bei 0° (p^0) reduziert werden nach der Formel:

$$p^0 = p^t \, (1 - 0{\cdot}000181 \, . \, t).$$

Jetzt rechnet man den Gehalt g des Kulturvakuums an Milligrammen Sauerstoff nach der Formel

$$g = \frac{20{\cdot}9}{100} \cdot \frac{273 + 0}{273 + t} \cdot \frac{p^0 - e}{760} \cdot 1{\cdot}4292 \, . \, 1000$$

in der e = Tension des Wasserdampfes der Tabelle I ist. Ist Kalilauge im Kulturgefäß, wird an Stelle von e k der Tabelle II eingesetzt.

Bredemann (l. c.) hat für eine Reihe Manometerstände die zugehörigen Sauerstoffmengen berechnet, die in Tabelle IV (S. 604) zusammengestellt sind.

Mit Hilfe der vorher genau beschriebenen Apparatzusammenstellung lassen sich demnach in sicherer Weise anaërobe Kulturen vornehmen und Reinzüchtungen anaërober Bakterien ausführen. Außerdem ist es möglich, mit ausreichender Genauigkeit die Sauerstoffminima für vegetative Bakterienzellen, für die Sporenbildung und für die Sporenkeimung zu bestimmen.

Kultur unter erhöhtem Druck in Preßluft oder Preßsauerstoff.

Unter den mehrfach beschriebenen Apparaten für Untersuchung des Bakterienwachstumes unter erhöhtem Druck in Preßluft oder komprimiertem Sauerstoff steht an erster Stelle derjenige von *Arthur Meyer.*[1]) Die ganze Einrichtung besteht aus einem Preßapparat und einem Druckraum mit den Manometern etc.

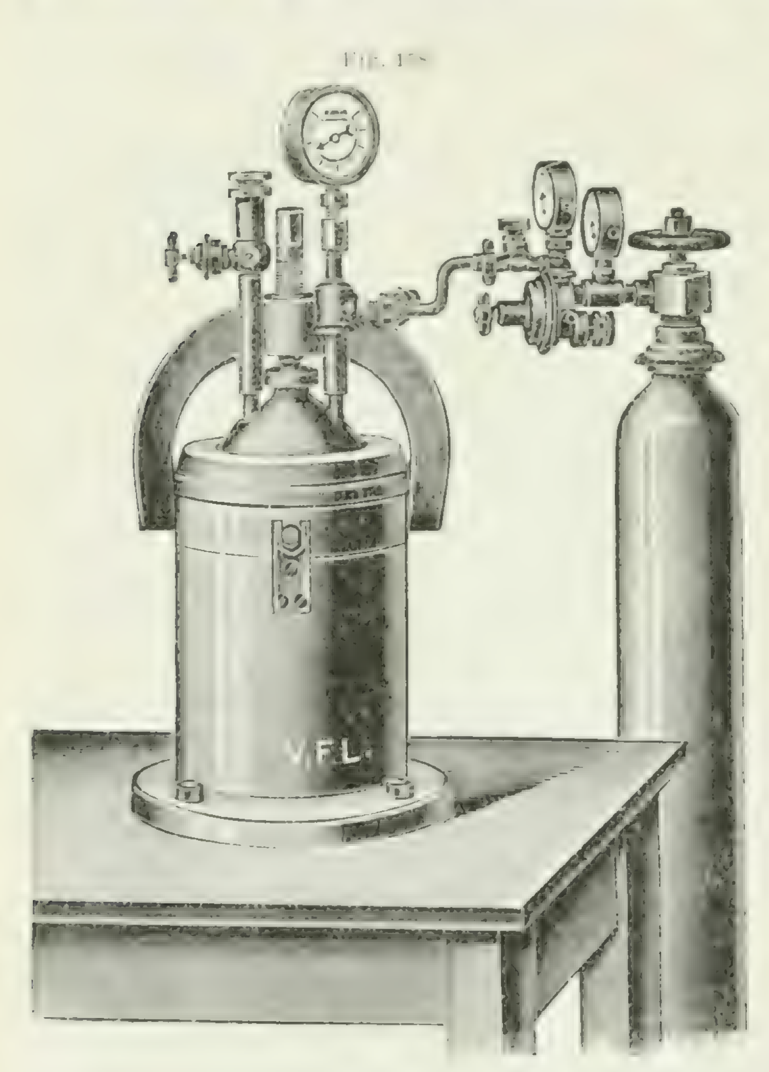
Als Preßapparat dient eine Stahlflasche, die mit komprimierter Luft gefüllt ist. Dieselbe hat einen Rauminhalt von ca. 10 *l* und die Luft steht unter einem Drucke von 100—150 *kg*. An dem Stahlzylinder wird mit Holländerverschraubung ein „S-Automat" angelegt. Derselbe ist aus zwei Federmanometern, einem Druckreduzierventil, einem Sicherheitsventil und einem Absperrhahn zusammengestellt. Das Anschlußrohr zur Gasüberleitung in den später zu beschreibenden Druckraum ist am besten aus Kupfer gefertigt. Das der Stahlflasche zunächst stehende Manometer dient zur Messung des Gesamtdruckes im Stahlzylinder, aus dem sich der Inhalt leicht berechnen läßt. Es darf aber nur bis zu einem Drucke von 150 *kg* gebraucht werden und trägt eine Skala mit einer Teilung nach 10 *kg*-Drucken. Die in der Flasche befindliche Luftmenge (m) wird nach der Formel m = p . l berechnet, in der p den abgelesenen Manometerdruck und l den auf der Stahlflasche angeschriebenen Rauminhalt derselben in Litern bedeutet.

Das zweite Manometer gehört zum Druckreduzierventil und zeigt an, unter welchem Druck das in den Druckraum einströmende Gas steht. Es wird entweder für einen Maximaldruck von 15 oder 30 *kg* geliefert und besitzt eine Skala mit 1 *kg* Teilung. In Verbindung mit diesem Druckmesser steht das Reduzierventil. Im wesentlichen besteht es aus einem Reduzierventilkasten, in den die Preßluft aus einer beliebig veränderlichen, aber kleinen Öffnung einströmt, wobei sie entspannt wird. Ein Hebelwerk, auf das eine Flügelschraube von außen einwirkt, besorgt die feine Verstellung der Größe der Einströmöffnung. Herausschrauben der Flügelschraube vermindert den Druck, Hineinschrauben erhöht ihn. Das Druckreduzierventil ist durch ein Sicherheitsventil gesichert. Unbenutzt soll die Druckreduzierschraube des Ventils immer so weit herausgeschraubt sein, bis kein Federdruck mehr darauf herrscht, was sich am leichten Gang sofort bemerkbar

macht. Zum Gebrauch schließt man den Automaten an die Stahlflasche an, dann öffnet man langsam den Radhahn des Stahlzylinders und überzeugt sich vom herrschenden Druck in demselben. Hierauf schraubt man vorsichtig die Flügelschraube des Druckreduzierventils so weit hinein, bis das Manometer desselben den gewünschten Arbeitsdruck anzeigt. Unter diesem strömt dann nach Öffnung des Absperrhahnes am Automaten die Preßluft so lange aus, als der Innendruck in der Stahlflasche ausreicht.

Der „Druckraum" ist ein für Preßgase besonders konstruierter Autoklav aus Kupfer, der auf 50 *kg* Druck geprüft ist und zum Arbeiten bis 25 *kg* dient. Der Druckraum selbst ruht in einem eisernen Mantel, der auf einem Arbeitstisch mit 3 Schrauben fix befestigt wird. Der Druckraum ist mit Zapfen in diesen Mantel fest eingelagert. Fig. 158 zeigt uns den ganzen Druckapparat in Verbindung mit dem Reduzierventil und der Stahlflasche fertig zusammengestellt. Mit einem starken Mantel, der mit drei Schrauben am Tische befestigt ist, ist in verschraubten Lagern der eigentliche Druckraum fest verbunden.

Fig. 158.



In der Fig. 159 ist das zylinderförmige Druckgefäß mit dem nebenliegenden Deckel wiedergegeben. Das Druckgefäß *K* ist 20 *cm* hoch und hat oben bei *R* einen äußeren Durchmesser von 15·5 *cm*, unten einen solchen von 13·5 *cm* und einen Rauminhalt von 2000 *cm*³. Oben am Kulturgefäß ragt nach außen und innen ein 3·5 *cm* breiter Rand *R* vor, so daß die Öffnung des Raumes nur 8·5 *cm* im Durchmesser mißt. Dieser breite Rand besitzt vier konzentrische Ringrillen. Unter dem Rande befindet sich der dicht angelegte Eisenring *E*, in dem auf Zapfen drehbar der starke Stahlbügel *B* mit der Schraube *S* ruht. Die Schraube drückt den Deckel nieder. Der Deckel selbst ist aus Phosphorbronze gefertigt und nach oben gewölbt. Mit einem 3·5 *cm* breiten Rande, der ebenfalls 4 Rillen trägt, sitzt er auf dem Rande des Kulturgefäßes auf. Außerdem paßt er mit der

wenig vorspringenden Ringleiste *F* genau in die Öffnung des letzteren. In den Deckel sind eingelötet und verschraubt 2 Röhren (siehe Fig. 158), von denen eine das Sicherheitsventil und die mit einem Hahne verschließbare Ausströmöffnung trägt, die andere ein Manometer und die mit einem Hahne abzuschließende Einströmöffnung. Das Sicherheitsventil ist ähnlich demjenigen des Druckreduzierventiles gebaut. Wichtig ist die Kenntnis der Konstruktion des Einströmhahnes, weil dessen Dichtung ab und zu ausgewechselt werden muß. In Fig. 160 ist ein Längsschnitt durch die Teile desselben wiedergegeben. *Arthur Meyer* [1]) (l. c. S. 391) beschreibt den Hahn: „Das Stück *b* sitzt an dem »Einströmrohre« seitlich an. Die Preßluft tritt durch ein Loch *l* ein, der Kanal *a* führt nach dem Kulturraume. *r* ist die Lederscheibe, welche beim Zuschrauben des Hahnes die Öffnung *a* schließt; *k* ist eine Kautschukplatte, welche zwischen die Ränder α und β geklemmt wird, wenn die Kappe *d* über das Stück *b* geschraubt worden ist. Das Stück *z* wird fest auf die Schraube δ aufgeschraubt und dichtet dabei die Kautschukscheibe an der Schraube ab. Das Stück δ der Schraube *s* paßt in das Loch des Zwischenstückes *z* so, daß es sich leicht darin dreht. Zieht man die Schraube *s* an, so schließt man die Öffnung α. Die Kautschukplatte *k* schließt dauernd den von ihr bedeckten Raum in *b* ab."

Fig. 159.

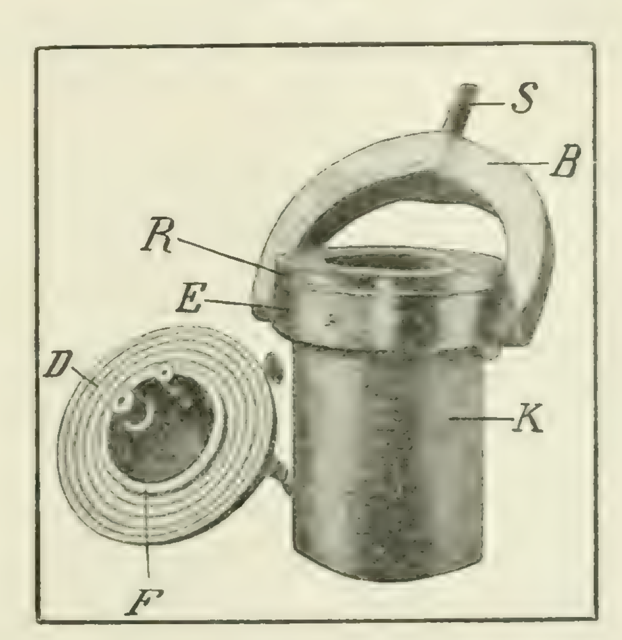


Fig. 160.

Dem Apparat ist ein entsprechendes Federmanometer beigegeben, dessen Skala nach $^1/_4$ *kg* Druck eingeteilt ist. In den meisten Fällen ge-

[1]) *Arthur Meyer*, Apparat für die Kultur von Bakterien bei hohen Sauerstoffkonzentrationen, sowie zur Bestimmung der Sauerstoffmaxima der Bakterienspezies und der Tötungszeiten bei höheren Sauerstoffkonzentrationen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. **16**. 1906. S. 386.

nügt dieses Manometer. Für relativ niedere Drucke unter 5 *kg* empfiehlt sich die Anschaffung eines zweiten passenden Federmanometers, welches eine in $^1/_{10}$ *kg* geteilte Skala mit dem Meßbereich von 1—5 *kg* aufweist. Für die Messung sehr niedriger Überdrucke von 1—2 *kg* verwendet *Arthur Meyer* sein „Quecksilbermanometer", das im vorhergehenden Abschnitt auf Seite 597 bereits beschrieben ist.

Das Arbeiten mit diesen Apparaten gestaltet sich nun nach *Arthur Meyer* (l. c. S. 393) folgendermaßen: „Man stellt zuerst das Reduzierventil des Preßgasapparates auf den Druck ein, bei dem das Wachstum stattfinden soll, stellt dann die Kulturen in den Druckraum, dessen Boden man mit etwas Wasser bedeckt hat und legt den Deckel auf.

Dazu wird die vorher in Wasser getauchte Gummischeibe, wenn sie noch neu ist, am Rande mit einer Marke (einem sehr kleinen Ausschnitt z. B.) versehen und so auf den Rand des Deckels aufgelegt, daß die Marke über der Zahl liegt, die sich am Rande des Deckels befindet. Der Deckel wird dann so aufgelegt, daß seine Zahl über der in den Rand des Kulturgefäßes eingeschlagenen Zahl zu liegen kommt." Dann stellt man den Bügel hoch und schraubt die Schraube desselben (s. Fig. 159) fest, damit der Deckel stark niedergedrückt wird und so Rillen in die neue Scheibe gepreßt werden. Alle Viertelstunden etwa 4—5mal wird die Schraube mit dem Schlüssel maximal nachgezogen. Dann erst nimmt man den Apparat in Gebrauch. Man verbindet den Preßapparat mit dem Druckapparat und läßt nach richtiger Einstellung des Reduzierventils durch Öffnen des Einströmhahnes langsam so lange Preßluft einströmen, bis das Manometer des Druckgefäßes den gewünschten Druck anzeigt. Dann schließt man alle Hähne. Bei der Entnahme der Kulturen ist darauf zu achten, daß nur langsam die Luft aus dem Druckgefäße ausströmt, wozu die Auslaßöffnung unter dem Sicherheitsventil (Fig. 158) dient. Gallertige Nährböden werden sonst von der rasch ausströmenden Luft vollständig zerrissen. Deshalb vermindert man zuerst den Druck auf etwa 2 *kg* und schließt wieder den Druckraum. Jetzt lüftet man ein wenig die Verschlußschraube am Bügel, damit der noch herrschende Überdruck den Deckel lockert. Dann erst läßt man langsam die Preßluft vollständig austreten.

Die in dem Druckgefäß herrschenden Sauerstoffmengen werden nun nach *A. Meyer* (l. c.) nach folgender Formel berechnet, wenn Federmanometer zur Anwendung kommen:

$$\text{Milligramm O in der Preßluft} = \frac{20\cdot9}{100} \cdot \frac{273+0}{273+t} \cdot \frac{a+(k\,.\,735\cdot5)}{760} \,.\, 1\cdot4292\,.\,1000.$$

Darin bedeutet:

t = Lufttemperatur in dem Druckraum bei der Manometerablesung;
a = Barometerstand bei der Aichung des Manometers;
k = am Manometer in Kilogrammen abgelesener Druck im Druckraum;
20·9 = Volumprozente O in der atmosphärischen Luft;
—273 = absoluter Nullpunkt.

735·5 = Höhe einer Quecksilbersäule in Millimetern, die bei 0° 1 *kg* Druck auf den Quadratzentimeter ausübt;
1·4292 = Gewicht eines Liters O bei 760 *mm* Quecksilber, 0° und 45° geographische Breite, in Grammen ausgedrückt.

Für das gewöhnliche Federmanometer ist für k 760 einzusetzen. Bei den feinen Federmanometern ist der Barometerstand, bei dem sie geaicht wurden, angegeben.

Die folgende Zusammenstellung I enthält die Konzentration des Sauerstoffes in dem mit Preßluft gefüllten Kulturgefäß, ausgedrückt in Milligrammen im Liter bei einem Überdruck von 2—20 *kg* und den Temperaturen zwischen 17 und 28° C unter Verwendung des Federmanometers. (Nach *A. Meyer*, l. c. S. 395.)

Tabelle I.

Am Manometer abgelesener Druck *kg*	Lufttemperatur im Druckgefäß, Grad C											
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
2	824	821	818	816	813	810	807	804	802	799	797	794
3	1097	1093	1089	1086	1082	1078	1075	1071	1067	1064	1060	1057
4	1372	1368	1363	1358	1354	1349	1344	1340	1335	1331	1326	1322
5	1642	1636	1631	1625	1620	1614	1609	1603	1598	1593	1588	1582
6	1915	1908	1902	1895	1889	1883	1876	1870	1863	1857	1851	1845
7	2185	2177	2170	2163	2155	2148	2141	2133	2126	2119	2112	2105
8	2458	2449	2442	2433	2424	2416	2408	2399	2392	2384	2376	2368
9	2728	2718	2709	2700	2691	2682	2672	2663	2654	2646	2637	2628
10	3001	2990	2980	2970	2960	2950	2940	2930	2920	2910	2900	2891
11	3273	3262	3251	3240	3229	3218	3207	3196	3185	3175	3164	3154
12	3546	3534	3522	3510	3498	3486	3474	3464	3451	3439	3428	3416
13	3819	3805	3793	3780	3767	3754	3741	3728	3716	3704	3692	3679
14	4091	4077	4064	4050	4036	4022	4009	3994	3982	3968	3955	3942
15	4364	4349	4335	4320	4305	4290	4276	4261	4247	4233	4219	4205
20	5714	5694	5675	5655	5636	5617	5598	5578	5561	5542	5524	5505

Wird zur Messung von Überdrucken unter 2 *kg* das „Quecksilbermanometer" benutzt, dann muß besonders langsam die Preßluft in das Druckgefäß eingelassen werden. Außerdem müssen die Apparate längere Zeit in dem gleichtemperierten Arbeitsraum stehen, damit alles gleichmäßig erwärmt ist.

Zur Berechnung der im Liter Druckluft vorhandenen Sauerstoffmenge bestimmt man folgende Größen:

1. Die Höhe der drückenden Quecksilbersäule (p^t). Man liest am Barometer den Quecksilberstand am langen (l) und kurzen (k) Schenkel ab. l—k = Barometerstand = b. Die gleiche Ablesung macht man an der Quecksilbersäule des Manometers. l'—k' = Manometerdruck = m. Barometerdruck und Manometerdruck addiert geben den Druck im Innern des Preßgefäßes (p^t):

$$p^t = b + m.$$

2. Temperatur (t) der Quecksilbersäulen und der Preßluft im Druckraum. t muß in beiden gleich groß sein, weshalb man die Zusammenstellung einige Zeit stehen läßt, bis der Temperaturausgleich erfolgt.

3. p^t muß nun auf p^0 reduziert werden. p^0 entspricht der Länge der bei t Graden gemessenen Quecksilbersäule bei 0°.

$$p^0 = p^t\,(1 - 0{\cdot}000181\,t).$$

4. Dann ist aus der Tabelle (S. 600) die Tension (e) des Wasserdampfes über Wasser in Millimeter Quecksilber bei Temperatur t nachzusehen.

Die Berechnung der Sauerstoffmenge im Liter der Preßluft in Milligrammen erfolgt nach der Formel:

$$\frac{20{\cdot}9}{100} \cdot \frac{273 + 0}{273 + t} \cdot \frac{p^0 - e}{760} \cdot 1{\cdot}4292 \,.\, 1000,$$

worin die übrigen Größen dasselbe bedeuten, wie in der früheren Formel auf S. 608.

Arthur Meyer (l. c. S. 396) hat eine Zusammenstellung ausgearbeitet, die in Milligrammen die Sauerstoffmengen im Liter der Preßluft für Drucke zwischen 760 und 1550 *mm* Quecksilber und Temperaturen zwischen 17 und 28° C angibt und im folgenden als Tabelle II wiedergegeben ist.

Tabelle II.

Abgelesener u. berechneter Überdruck	Lufttemperatur im Druckgefäß, Grad C											
(p_t) *mm* Hg.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
760	275	274	272	271	270	268	267	265	264	263	261	260
800	290	288	287	286	284	283	281	280	278	277	275	274
850	308	307	305	304	302	301	299	298	296	295	293	292
900	327	325	324	322	320	319	317	316	314	312	311	309
950	345	344	342	340	339	337	335	334	332	330	329	327
1000	363	362	360	359	357	355	353	352	350	348	347	345
1050	382	380	378	377	375	373	372	370	368	366	364	362
1100	400	399	397	395	393	391	390	388	386	384	382	380
1150	419	417	415	413	411	409	408	406	404	402	400	398
1200	437	435	433	432	430	428	426	424	422	420	418	416
1250	456	454	452	450	448	446	444	442	440	438	436	434
1300	474	472	470	468	466	464	462	460	457	455	553	451
1350	492	490	488	486	484	482	480	478	476	473	471	469
1400	510	509	507	505	502	500	498	496	494	491	489	487
1450	529	527	525	523	520	518	516	514	512	509	507	504
1500	548	546	543	541	539	536	534	532	529	526	524	522
1550	566	564	561	559	557	555	552	550	547	545	542	540

An Stelle von Preßluft kann natürlich auch komprimierter Sauerstoff oder Stickstoff etc. verwendet werden. In diesem Falle muß zuerst das käufliche komprimierte Gas auf seine Reinheit mit den üblichen chemischen Methoden untersucht werden. Wenn Verunreinigungen vorliegen, so ist der Volumprozentgehalt s an reinem Gase nach den gasanalytischen Methoden zu ermitteln, nachdem man das verunreinigte Gas von der Kohlensäure befreit hat.

Die Berechnung der Sauerstoffmenge in Milligrammen im Liter erfolgt nach der auf Seite 608 angegebenen Formel für die Bestimmung des Luftsauerstoffes, in der an Stelle der Größe für 20·9 (Volumprozent O der Luft) s eingesetzt wird. Sie lautet demnach

$$\frac{s}{100} \cdot \frac{273 + 0}{273 + t} \cdot \frac{760 + (k \,.\, 735{\cdot}5)}{760} \,.\, 1{\cdot}429 \,.\, 1000,$$

wenn das gewöhnliche Federmanometer zur Anwendung gelangt. Analog kann man auch die Mengen anderer komprimierter Gase berechnen. Wird nur mit schwachen Überdrucken bis $2\,kg$ gearbeitet, so kann natürlich auch das Quecksilbermanometer Verwendung finden. Bei der Berechnung ist die Formel der Seite 610 entsprechend abzuändern.

Gewinnung und Zucht der Eisenbakterien.

Molisch[1]) ist es gelungen, auch Reinkulturen von Eisenbakterien zu erhalten. Auch gibt er uns eine Reihe leicht zugänglicher Fundstellen für die Gewinnung bekannt, auf die vorerst näher eingegangen werden soll.

Siderocapsa Treubii nov. gen. et nov. sp. (Molisch, l. c.)

Eine weit verbreitete Wasserbakterie, die auf zahlreichen eingetauchten Teilen höherer Wasserpflanzen des Süßwassers epiphytisch lebt. Man erhält sie rasch, wenn man ältere Sprossen von Elodea, die Unterseite der Nymphaeablätter oder „Wurzelhaare" von Salvinia auriculata mikroskopiert. Die Oberfläche dieser Teile erscheint von einer ockerfarbigen Kruste überzogen, die von lauter kleinen hellen Höfen durchsetzt ist. Bei der Behandlung der Kruste mit dem *Schiff*schen Reagens auf Aldehyd bemerkt man in dem tiefrot umwallten runden Hof die Bakterienzellen von Kugelform.

Chlamydothrix sideropous n. sp. (Molisch, l. c.)

Soll nach *Molisch* eine häufige Art sein, die Fäden bildet und in Haftscheiben auf Blättern verschiedener Wasserpflanzen festsitzt. Die Zellfäden speichern in ihrer Scheide an der Spitze kein Eisen, wohl aber ist ihre Basis und besonders die rundliche Haftscheibe von Eisenoxydhydrat durchsetzt. Die Zellen haben eine zylindrische Gestalt.

Auch die anderen Eisenbakterien Cladothrix, Crenothrix, Leptothrix, Clonothrix und Gallionella sind Wasserbewohner und finden sich ziemlich häufig in den stärker eisenhaltigen Wässern.

Nährsubstrat für die Zucht von Leptothrix ochracea. (Molisch, l. c.)

1000 g Torfwasser,
0·25 g Manganpepton,
100 g Gelatine.

[1]) *Hans Molisch*, Die Eisenbakterien. Gustav Fischer, Jena, 1910.

Vor dem Erstarren durch Zusatz von Normalkalilauge leicht alkalisch zu machen.

Das Torfwasser wird durch Auskochen eines faustgroßen Stückes Torfziegel in 1 Liter destilliertem Wasser hergestellt.

Manganpepton scheint eine sehr ungleiche Substanz zu sein, da *Molisch* mit Proben verschiedener Herkunft mitunter schlechtere Erfolge hatte. Er empfiehlt besonders das Manganpepton der chemischen Fabrik *List*, Seelze bei Hannover.

Für die Reinzucht dieser Eisenbakterie empfiehlt *Molisch* die Anlegung einer Rohkultur in einer 0·05$^0/_0$igen Manganpeptonlösung im Prager Leitungswasser (Flußwasser), in der sich die Leptothrix besonders an der Oberfläche als braune Haut ansiedelt. Von der Vorkultur legt man eine Kultur in einer 2$^0/_0$igen Peptonlösung im Moldau(Fluß-)wasser an. In dieser stickstoffreichen Nährlösung bilden die Fäden rasch Schwärmer aus, die dann in der Plattenkultur mit dem erstgenannten Gelatinenährboden reingezüchtet werden.

Darstellung von Lipoiden aus Gehirn und anderen Geweben.

Von **Sigmund Fränkel**, Wien.

In Folgendem sollen hauptsächlich die Methoden beschrieben werden, welche in unserem Institute zur Aufarbeitung der Lipoide Verwendung finden und insbesondere diejenigen, welche sich auf die Verarbeitung des Gehirns beziehen. Für die anderen Organe müssen jeweilig die Methoden abgeändert werden, nach speziellen Erfahrungen, welche man erst bei der Aufarbeitung gewinnt. Uns stehen solche Erfahrungen für Leber, Nebenniere, Niere, Placenta, Pankreas, Magen- und Darmschleimhaut, sowie für Prostata zur Verfügung. Wir haben es bei einzelnen Organen vorgezogen, statt der Reihenfolge der Extraktionsmittel: Aceton, Petroläther, Alkohol oder Ligroin, gleich mit Petroläther zu beginnen und die petrolätherische Fraktion vorerst mit Aceton und dann erst mit Alkohol zu scheiden (s. p. 635). Will man nur einzelne Substanzgruppen gewinnen und die übrigen vorläufig nicht verarbeiten, so kann man, je nach Bedarf, die hier beschriebene und vorgeschlagene Methodik entsprechend verkürzt anwenden.

Eine der wichtigsten Fragen und jedenfalls das schwierigste Problem bei der Aufarbeitung und Gewinnung der Lipoide ist das Trocknen des zu untersuchenden Materials. Wir haben nach dieser Richtung hin die verschiedensten Versuche gemacht und keine in der Literatur vorhandene Angabe unberücksichtigt gelassen und sind nun in der Lage, auf Grund unserer sehr ausgebreiteten Erfahrung positive Vorschläge zu machen und Verfahren anzugeben, deren wir uns selbst bedienen, die wir aber keineswegs als endgültig ansehen, weil wir vielmehr bemüht sind, unsere Methodik fortwährend zu verbessern und die gute durch eine bessere zu ersetzen. Nicht in letzter Linie kommt hier die Geldfrage sowie die Frage nach der Feuergefährlichkeit der Aufarbeitung großer Massen in Betracht.

Leider sind in letzter Zeit einige Kritiken der Methoden der Lipoidforschung erschienen, die lediglich vom Schreibtisch aus auf Grund von Literaturexzerpten die Arbeitsmethoden beurteilen [1]; keineswegs aber können solche Kritiken und Ratschläge einen Fortschritt auf diesem experimentell sehr schwierigen Gebiete zeitigen. Vielmehr ist es notwendig, daß lediglich die experimentell Lipoide bearbeitenden Forscher ihre Erfahrungen austauschen und fortwährend Verbesserungen an ihren Methoden einführen.

[1] Vor allen sei hier auf *J. Bang*, Chemie und Biochemie der Lipoide, Wiesbaden bei J. F. Bergmann, 1911, p. 27—44, verwiesen.

Entwässerung, Trocknung.

Die älteren Forscher bedienten sich zur Entwässerung, insbesondere des Gehirns, des Äthylalkohols und diese Methodik, die nun weit über 100 Jahre alt ist, war bis in die letzte Zeit die vorherrschende. Die Methodik der Alkoholbehandlung, die nicht nur eine Entwässerung, sondern zugleich eine Extraktion ist, hat mehrere Nachteile. In den Alkohol gehen außer dem Wasser auch die ungesättigten Phosphatide über und, wenn man später heißen Alkohol verwendet, zugleich die gesättigten Verbindungen überhaupt, so daß man mit dem Alkohol aus dem Gehirn bei kalter und warmer Verwendung dieses Lösungsmittels bis auf das Kephalin, welches in dem Phosphatidgemenge trotz seiner Unlöslichkeit in Alkohol zum Teil in Lösung geht, fast alle lipoiden Substanzen extrahieren kann. Die großen Schwierigkeiten, aus diesem extrahierten Gemenge dann die einzelnen Gruppen und Substanzen zu isolieren, findet man ausführlich in *Thudichums* Buch über Gehirnchemie[1]) beschrieben. Ich habe in meiner Darstellung der Gehirnchemie[2]) besonders dieser Entwässerungs- und Extraktionsart die großen Widersprüche und Mißerfolge auf diesem Gebiete zugeschrieben. Auch *A. Erlandsen*[3]) muß beim Herzen von der Alkoholtrocknung absolut abraten und hält die Vakuumtrocknung für unanwendbar. Es ist auch seit dieser Zeit, als von meiner Seite andere Vorschläge gemacht und von meinen Mitarbeitern ausführlich durchgearbeitet wurden, die alte Methodik verlassen worden und die meisten Untersuchungen auf diesem Gebiete haben tatsächlich die von uns vorgeschlagene Methodik benutzt, wenn auch einige, wie das immer bei einer neuen Arbeitsweise anfangs vorkommt, sich in Modifikationen gefallen haben, die, wie wir sehen werden, das Verfahren nicht gerade verbesserten, sondern eher verschlechterten.[4])

Ursprünglich haben wir die Gehirne insbesondere, sowie auch andere Organe, mit Aceton entwässert und für manche Zwecke, wo es sich nicht um empfindliche Substanzen handelte, um Aceton zu sparen, einen großen Teil des Wassers bei mäßiger Temperatur auf dem Wasserbade entfernt, wobei sehr viel Wasser aus dem Gehirnbrei sich auspreßt und einfach abgeschüttet werden kann. Wir haben diese Methodik aber sehr bald verlassen, da das Erwärmen des Hirns manche Substanzen dermaßen verändert (insbesondere wenn man größere Quanten aufarbeitet und nicht rasch genug operieren kann), daß die gesättigte Gruppe sehr stark gefärbt wird. Das Trocknen mit reinem Aceton in der Kälte, welches wir gleichzeitig verwendet haben, ist durchaus keine ideale Methode. Vor allem erfordert sie sehr große Quanten Aceton, den man wegen seines Wassergehaltes später nicht

[1]) *J. L. W. Thudichum*, Die chemische Konstitution des Gehirns der Menschen und der Tiere. Tübingen bei F. Pietzcker. 1901. p. 74—87.

[2]) *Sigmund Fränkel*, Gehirnchemie in *Asher-Spiro*, Ergebnisse der Physiologie. VIII. 212—253 (1909). Wiesbaden bei J. F. Bergmann.

[3]) *A. Erlandsen*, Untersuchungen über die lecithinartigen Substanzen des Myocardiums und der quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **51**. 71 (1907).

[4]) *Jakob Parnas*, Über Kephalin. Biochemische Zeitschrift. **22**. 411 (1910).

verwenden kann. Aber man ist doch in der Lage, auf diesem Wege, wenn auch mit großen Apparaturen, vorwärts zu kommen und die Gehirnmassen gut aufzuarbeiten. Diese Methodik der Entwässerung mit Aceton hat später auch *Jakob Parnas* übernommen, aber nicht folgerichtig fortgesetzt, da er sofort die Benzinextraktion anschloß.

Das Trocknen von Hirn im Vakuum, welches wohl das Idealste wäre, haben wir mit unseren Apparaturen leider bei größeren Quanten nicht durchführen können, wie ja überhaupt das Trocknen kolloidaler Substanzen im Vakuum bei mäßigen Temperaturen sehr schwierig und nur auf eigens konstruierten Apparaten durchführbar ist. Mit kleinen, sehr niedrig erwärmten Vakuum-Trockenschränken, wie sie in Laboratorien üblich sind, kann man so viel Material, wie man es zur Aufarbeitung der Lipoide benötigt, nicht verarbeiten, und insbesondere, wenn man darauf hinzielt, nicht nur Individuen zu isolieren, sondern auch deren Hydrolyse durchzuführen, keine guten Erfolge erzielen. Auch das Trocknen ohne Vakuum mit warmer Luft, wie etwa mit dem *E. S. Faust*schen Apparate [1], hat sich, für das Gehirn wenigstens, nicht bewährt, während es bei anderen Geweben, die weniger lipoidreich sind, sicherlich von großem Vorteil sein kann. *V. Rubow* [2]) trocknete Herzen, die in kleine Stückchen geschnitten und auf flachen Schalen ausgebreitet waren, bei Zimmertemperatur in einem geschwind wechselnden Luftstrom, hervorgebracht durch einen kleinen elektrischen Ventilator. *A. Erlandsen* [3] hat diese Methode (verändert) bei der Verarbeitung von Herzmuskeln verwendet. Er konnte 5 *kg* Muskeln in 36—48 Stunden bis zum Pulver aufarbeiten.

Man hat schon mehrfach den Vorschlag gemacht, zur Darstellung von Cholesterin aus dem Gehirn letzteres in der Weise zu verarbeiten, daß man das Wasser des Gewebes an anorganische Salze bindet und so das feuchte Gewebe in ein trockenes Pulver verwandelt. Zuerst wurde Gips für diese Zwecke benutzt.[4] Es hat auch *A. Windaus* [5] Gips mit Vorteil bei der Verarbeitung von Nieren auf Cholesterin und Cholesterinester verwendet. Man muß zu diesem Zwecke die dreifache Menge wasserfreien Gips zu der fein zerriebenen Masse zusetzen, gut durcharbeiten und dann erhärten lassen. Man bekommt auf diese Weise wohl sehr rasch ein trockenes Pulver, aber man vermehrt das Volumen auf das Vierfache, so daß man sehr große Extrak-

[1]) *E. S. Faust,* Über das Fäulnisgift Sepsin. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 51. 248 (1904).

[2]) *V. Rubow,* Über den Lecithingehalt des Herzens und der Nieren. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 52. 173 (1905).

[3]) *A. Erlandsen,* Untersuchungen über die lecithinartigen Substanzen des Myokardiums und der quergestreiften Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 51. 71 (1907).

[4]) U. A. hat *O. Rosenheim,* On the preparation of cholesterin from brain. Journ. of physiology. 34. 104 (1906), Cholesterin auf diese Weise dargestellt; ferner seine Mitarbeiterin *M. Christine Tebb,* The cholesterin of the brain. Journal of physiology. 34. 106 (1906).

[5]) *A. Windaus,* Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren. Zeitschr. f. physiol. Chemie. 65. 110 (1910).

tionsapparate benutzen muß; so kann man diese Methodik wohl nur mit Vorteil bei kleinen Versuchen verwenden, wie es auch *A. Windaus* getan hat.

Für die Darstellung von Cholesterin und auch für Protagon hat man vorgeschlagen, das zerkleinerte Hirn mit ungefähr der anderthalbfachen Menge wasserfreien Natriumsulfats zu zerreiben und dann durch ein Sieb zu reiben. *R. Bünz*[1]) hat zuerst dieses Verfahren vorgeschlagen, dann haben *A. C. Lochhead* und *W. Cramer*[2]) dieses Verfahren verwendet. Wir wurden auf dieses Verfahren erst aufmerksam, nachdem wir mit *Aladar Elfer* eine Methodik veröffentlicht hatten, Blut, insbesondere Blutserum mit Glaubersalz zu trocknen und dann die Lipoide aus diesem trockenen Pulver zu extrahieren.[3]) Beim Serum ermittelten wir vorerst den Wassergehalt und setzten dann um 10% mehr als die berechnete Menge gut ausgeglühten Glaubersalzes zu. Um das ganze Wasser von 1 *kg* Serum zu binden, wären nun theoretisch 610 *g* geglühten Glaubersalzes notwendig. Wir setzen aber ca. 670 *g* pro 1 *kg* Rinderserum zu. In 1—2 Stunden ist das Serum zu einer festen Kristallmasse erstarrt, die man im Stahlmörser oder auf der Kugelmühle pulvern kann.

Dasselbe Verfahren nun verwendeten wir bei einer Reihe von Geweben, insbesondere aber beim Gehirn. Da das Gehirn im Durchschnitt 70% Wasser hat, kommt man mit viel weniger Glaubersalz aus als beim Serum. 142 Teile geglühten Glaubersalzes vermögen 180 Teile Wasser zu binden. Auf 1 *kg* Hirn verbrauchen wir nur 600 *g* Glaubersalz, so daß die Beschwerung nur 60% ausmacht, während die früher erwähnten Forscher das Gewebe mit der anderthalbfachen Menge, also mit 150% beschweren. Das ist durchaus kein unwesentlicher Vorteil.

Aber so gute Resultate dieses Verfahren in unseren Händen auch gezeitigt hat, und so häufig wir es auch in verschiedenen Fällen angewendet, so konnten wir uns doch bei unseren Erfahrungen nicht der Erkenntnis verschließen, daß dieser Methodik einige Fehler anhaften. Als solche Fehler sehen wir folgende an: Es ist sehr schwer, die Substanz nach dem Auskristallisieren mit Glaubersalz in größeren Mengen sehr fein zu pulvern und man hat viele große Kristalle vor sich, so daß die Extraktion sehr lange dauert. Ein zweiter Nachteil, der sehr ins Gewicht fällt, ist, daß die ungesättigten Phosphatide, insbesondere das Kephalin, wie wir schon in den Untersuchungen mit *E. Neubauer*[4]) gezeigt haben, Glaubersalz in Petroläther aufzulösen vermögen, und zwar etwa 17% ihres Eigengewichtes. Wir haben uns auch überzeugt, daß bei der Verarbeitung des Gehirns nach dieser Methode das dargestellte Kephalin deutlich die Reaktion der Schwefelsäure gab. Ein weiterer

[1]) *R. Bünz*, Über das Vorkommen von Cholesterinester im Gehirn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **46**. 47 (1905).

[2]) *A. C. Lochhead* und *W. Cramer*, On the phosphorus percentage of various samples of protagon. Biochem. Zeitschr. **21**. 321 (1909).

[3]) *Sigmund Fränkel* und *Aladar Elfer*, Über ein Verfahren der Serumtrocknung. Biochem. Zeitschr. **28**. 330 (1910).

[4]) *S. Fränkel* und *E. Neubauer*, Über Kephalin. Biochem. Journ. **2**. 350 (1907).

Nachteil war, daß bei den Extraktionen, selbst mit sehr leicht siedendem Petroläther, am Boden des Extraktionskolbens sich ein wenig mit Glaubersalz gesättigte Flüssigkeit absetzte. Dieser letztere Nachteil konnte aber durch neuerliches Aufnehmen des Bodensatzes in Petroläther behoben werden.

Wir suchten nun nach einem anderen Trocknungsverfahren, welches all die Vorteile hat, die man durch das Prinzip des Bindens von Wasser an wasserfreie anorganische Salze erzielen kann, aber ohne die bei unserer Glaubersalzmethode beobachteten Nachteile ist. Wir haben mit Vorteil versucht, sowohl bei Gehirn als auch bei Blut und Leber, diese Gewebe in der Weise zur Trockene zu bringen, daß wir sie mit etwas mehr als der berechneten Menge wasserfreien, phosphorsauren Natrons behandelten. Wir verwenden das Dinatriumphosphat, welches 12 Moleküle Kristallwasser bindet. Es ist zweckmäßig, das Dinatriumphosphat (gewöhnliches einfach saures phosphorsaures Natron) selbst im Laboratorium zu entwässern, um kein pyrophosphathaltiges Material zu bekommen. Bei der Bereitung hielten wir uns an eine Angabe von *T. C. Whitlock* und *C. E. Barfield* [1]) und entwässerten das Salz bei einer Temperatur von 150 bis 170°. 142 Teile des wasserfreien Salzes binden nun 216 Gewichtsteile Wasser. Für 1 *kg* Hirn mit 700 *g* Wasser benötigt man also mit einem Aufschlag von etwa 10% insgesamt 500 *g* des wasserfreien Natriumphosphates, so daß theoretisch die Beschwerung nur 50% wäre, während sie beim Glaubersalz ca. 60% beträgt. Aber wir haben bei Ausarbeitung dieser Methode beobachten können, daß sie gegenüber der Glaubersalzmethode noch einige andere große Vorteile besitzt. Wenn man den Gehirnbrei rasch in womöglich im Thermostaten vorgewärmten Reibschalen mit dem Phosphat zusammenbringt, so bleibt die Masse flüssig und man sieht, wie eine konzentrierte Salzlauge in der Masse verteilt ist. Bringt man nun rasch diese noch warme Mischung in eine ebenfalls auf 40° gewärmte Presse, so gelingt es, einen sehr großen Teil des Natriumphosphats mitsamt dem Wasser abzupressen. Auf diese Weise verringert man das Volumen sehr beträchtlich. Es beruht dies darauf, daß die Kristalle des Natriumphosphats mit 12 Mol. Wasser bei 35° schmelzen und selbst nach dem Erkalten bleiben die geschmolzenen Kristalle nach *Marx* lange Zeit flüssig, werden dann sirupartig und gestehen endlich zu einer seidenglänzenden, strahligen Masse.[2])

Die Methode des Arbeitens mit Natriumphosphat hat nun gegenüber den vorher beschriebenen nach unseren Erfahrungen den Vorteil, daß man von Haus aus das Gewebe mit weniger Salz beschwert, daß man aber einen großen Teil des Salzes und mit ihm des Wassers abpressen kann und somit sowohl das Volumen als auch das Gewicht des zu extrahierenden Gutes ungemein verringert. Bei der Extraktion geht das Natriumphosphat nicht in die Lösungsmittel, man erhält auch am Boden der Ex-

[1]) *T. C. Whitlock* und *C. E. Barfield*, Entwässerung der Natriumphosphatkristalle. Americ. Chem. Journ. **22**. 214 (1897).

[2]) *Gmelin-Kraut*, Handbuch der anorganischen Chemie. 7. Aufl. 2. 1. T. 393 (1906) Heidelberg bei Carl Winter.

traktionsgefäße nicht die bei der Glaubersalzmethode beobachteten glaubersalzgesättigten Tropfen. Hingegen ist es möglich, nach der Phosphatmethode getrocknetes Hirn, Blut etc. zu einem ungemein feinen Pulver zu zerreiben, welches sich sehr leicht und viel besser als mit Natriumsulfat getrocknetes extrahieren läßt. Nur bei einem Leberversuch sahen wir, daß beim Extrahieren mit siedendem Ligroin ein wenig geschmolzenes Natriumphosphat durch die Filter mitging, sich aber nachher leicht von den organischen Substanzen durch Lösungsmittel trennen ließ.

Wir gehen in der Praxis in der Weise vor, daß wir die gewogene Gehirnmasse mit ihrem halben Gewicht trockenen Natriumphosphats, das wir in kleinen Portionen unter stetem Reiben zusetzen, in Schalen bei Körpertemperatur verreiben, dann das verriebene Gut in warme Tücher einschlagen, auf einer vorgewärmten Presse möglichst stark abpressen und dann in großen Glocken über Schwefelsäure oder auch an der Luft erstarren lassen. Hierauf läßt man das Gut, das man grob zerkleinert hat, durch eine Fleischmaschine laufen, welche sehr klein gelochte Einsätze hat. Bei diesem Prozeß zerfällt schon das Gut sehr leicht. Sollten sich noch feuchte Stellen zeigen, so genügt ein mehrstündiges Einbringen in evakuierte Glocken über Schwefelsäure, um die Masse in ein völlig trockenes, unter dem Pistill leicht zerfallendes feines Pulver zu verwandeln. Dieses wird hierauf den weiteren Prozeduren, z. B. dem Laufen über eine Kugelmühle resp. dem jetzt einsetzenden Extraktionsprozeß, unterworfen.

Von allen bis jetzt versuchten und angewandten Verfahren erscheinen uns für Gehirn die Methode der kalten Entwässerung mittelst Acetons sowie die Methode des Trocknens mittelst Natriumphosphats gegenwärtig als die besten. Das soll keinen Forscher auf diesem Gebiete abhalten, nach neueren und besseren Methoden zu suchen.

Auf eine alte Methodik möchten wir besonders aufmerksam machen, von der wir glauben, daß sie für manche Zwecke bei zweckmäßiger Modifikation zum Ziele führen kann. 1885 hat *F. Baumstark*[1]) eine Methodik beschrieben, bei welcher Gehirn in einem Gazenetze in einen Exsikkator gehängt oder auf einen durchlöcherten Einsatzboden gelegt wird, wobei am Boden des Exsikkators der achte Teil des Kubikinhaltes Äther vorhanden ist. Aus dem frischen Hirn tropft eine bluthaltige, wässerige Lösung ab. Den Äther erneuert man von Zeit zu Zeit wieder. Dann befreit man das Hirn von den Hirnhäuten, zerschneidet es in größere Stücke und wickelt diese in Gaze und legt die Gehirnmasse so in Äther ein, daß sie von Äther bedeckt ist. Die Gehirnmasse liegt auf einem Einsatzboden, so daß das Gehirnwasser immer nach unten abfließen kann. *F. Baumstark* beendete die Entwässerung trotz häufigen Wechselns des Äthers erst nach 2—3 Monaten und extrahierte dann mit Äther wieder zwei Monate. Man sieht gleich, daß eine solche Methodik für die

[1]) *F. Baumstark*, Über eine neue Methode, das Gehirn chemisch zu erforschen und deren bisherige Ergebnisse. Zeitschrift für physiologische Chemie. **9.** 145 (1885).

gegenwärtige Laboratoriumstechnik und für die großen Mengen, um die es sich handelt, in dieser Ausführung völlig ungeeignet ist, aber bei unseren Versuchen, diese Methode nachzuprüfen, glauben wir doch gesehen zu haben, daß man diesen Gedanken nicht ohneweiters verwerfen soll, sondern daß er ausbildungsfähig ist. Wenn man das Gehirn nach Abziehen der Häute und Abwaschen vom Blute, nachdem es die Fleischmaschine passiert hat, in Scheidetrichter füllt, und in einem dunkeln Raume mit frisch über Natrium destilliertem Äther übergießt und den Scheidetrichter schließt, so findet man schon am nächsten Tage 3 Schichten: 1. eine ätherische, über dem Gehirn stehende, 2. den Gehirnbrei, welcher auf einer dritten, opalisierenden, sehr stark eiweißhaltigen Flüssigkeit schwimmt. Letztere kann man durch den Hahn des Scheidetrichters ablassen. Leider hat Petroläther nicht dieselbe Wirkung, anscheinend, weil er sich viel weniger als Äther in Wasser löst. Wir konnten, mehrfach den Äther wechselnd, aus einem Gehirnbrei von 3600 *g* insgesamt eine wässerige Lösung von Eiweißkörpern von 1700 *cm*³ abscheiden und abpressen. Im Äther fanden wir dieselben Substanzen, wie in unseren Aceton- und Petrolätherfraktionen. Wir führen diese Versuche hier nur an, um zu zeigen, daß solche Erfahrungen älterer Forscher nicht ohneweiters wegen ihrer bisherigen Mißerfolge vom grünen Tische aus zu belächeln und zu verwerfen sind, sondern daß man sich bei Ausarbeitung eines solchen Gedankens, für bestimmte Zwecke wenigstens, wenn auch nach starker Modifikation der Grundidee, ihrer noch sehr gut bedienen kann; jedenfalls dann, wenn es sich um die Kontrolle auf anderem Wege gefundener Resultate handelt, um festzustellen, ob ein gewonnenes Produkt tatsächlich ein Primärprodukt oder etwa ein Spalt- oder Kunstprodukt ist.

Es wurde auch der Versuch gemacht, Lipoide direkt aus feuchten Geweben zu isolieren. Man muß sich vor Augen halten, daß dabei, insbesondere wenn man Äther oder Petroläther als Extraktionsmittel benützt, wie dies bis jetzt geschehen ist, nur daran zu denken ist, daß man Cholesterin, Cholesterinester und die ungesättigten Phosphatide erhält. Ferner ergibt sich eine andere Schwierigkeit nach der Richtung hin, daß einzelne ungesättigte Phosphatide aus ihren wässerigen Pseudolösungen mit Äther nicht extrahierbar sind, wie dieses schon *J. L. W. Thudichum* bekannt war.

Es ist bis jetzt nach keiner Richtung hin ein Beweis erbracht worden, daß chemische Verbindungen zwischen Lipoiden und Eiweißkörpern existieren. Es ist dieses auch höchst unwahrscheinlich, da man nach Extraktion von Geweben mit verschiedenen Lösungsmitteln und nach Verdauung des Rückstandes doch wieder Phosphatide erhalten müßte, was uns aber in unseren Versuchen durchaus nicht gelungen ist. Wir müssen daher die Existenz solcher Lipoideiweißsubstanzen in chemischem Sinne vorläufig leugnen; anders ist aber an eine physikalische Verbindung zwischen beiden zu denken.

Gegen die Methodik, Gehirne mit Aceton zu trocknen, hat *Ivar Bang*[1]) Einwendungen erhoben. Er vermißt den Beweis, daß Aceton die entsprechenden Dienste leistet und wünscht Kontrolluntersuchungen über die Zusammensetzung des Ätherextraktes einmal nach dem Trocknen und das andere Mal nach Acetonbehandlung. Für solche Untersuchungen schlägt er Herzmuskel als das bestgeeignete Material vor. Jedermann, der solche Einwände erhebt, muß vorerst sagen, weshalb er sie erhebt, oder mindestens ein Experiment ausführen, aber wir können bei unserem neuen Trocknungsverfahren mit Salz (Glaubersalz oder Natriumphosphat) genau die gleichen Beobachtungen machen wie bei dem früheren Verfahren der Acetontrocknung, müssen aber von vornherein sagen, daß eine Kontrolle einer Gehirnmethodik am Herzmuskel durchaus nichts beweisen würde, denn die Phosphatide der verschiedenen Organe sind, wie wir in zahlreichen Untersuchungen festgestellt haben, verschieden und wir haben schon öfter darauf hingewiesen, daß die Methodik der Lipoidextraktionen für jedes Organ erst adaptiert werden muß und selbst *Ivar Bang*, welcher auf S. 41 dieses Verlangen an uns stellt, sagt auf S. 28 wörtlich: „es ist demgemäß gar nicht gesagt, daß ein Darstellungsverfahren, das sich für gewisse Organe bewährt hat, nun auch allgemeine Gültigkeit besitzt; im Gegenteil, man muß überall für jedes bestimmte Organ erst die Versuchsbedingungen ausprobieren, auch kann dasselbe Organ unter wechselnden Umständen sich recht verschieden verhalten“, was wir alles um so eher bestätigen, als diese Behauptung *I. Bangs* auf unseren Versuchen und auf unseren Darstellungen basiert. Vorläufig haben wir über pathologische Organe noch nicht genügende Erfahrungen, um ihnen unsere Methodik zu adaptieren, und gehen genau so vor wie bei physiologischen. Jüngst hat *Rudolf Allers*[2]) diese Methodik der Acetonextraktion mit großem Vorteil bei der Untersuchung pathologischer Gehirne (senile Demenz) verwendet und hierbei das Auftreten von Spaltungsprodukten der hochkomplexen Phosphatide wahrscheinlich gemacht.

Methodik der Extraktion.

Als Ausgangsmaterial verwenden wir insbesondere bei Gehirnen menschliches Material, da uns dieses leichter zugänglich ist als tierisches und da auch der Lipoidgehalt ein höherer und die Gehirne sehr schwer sind.

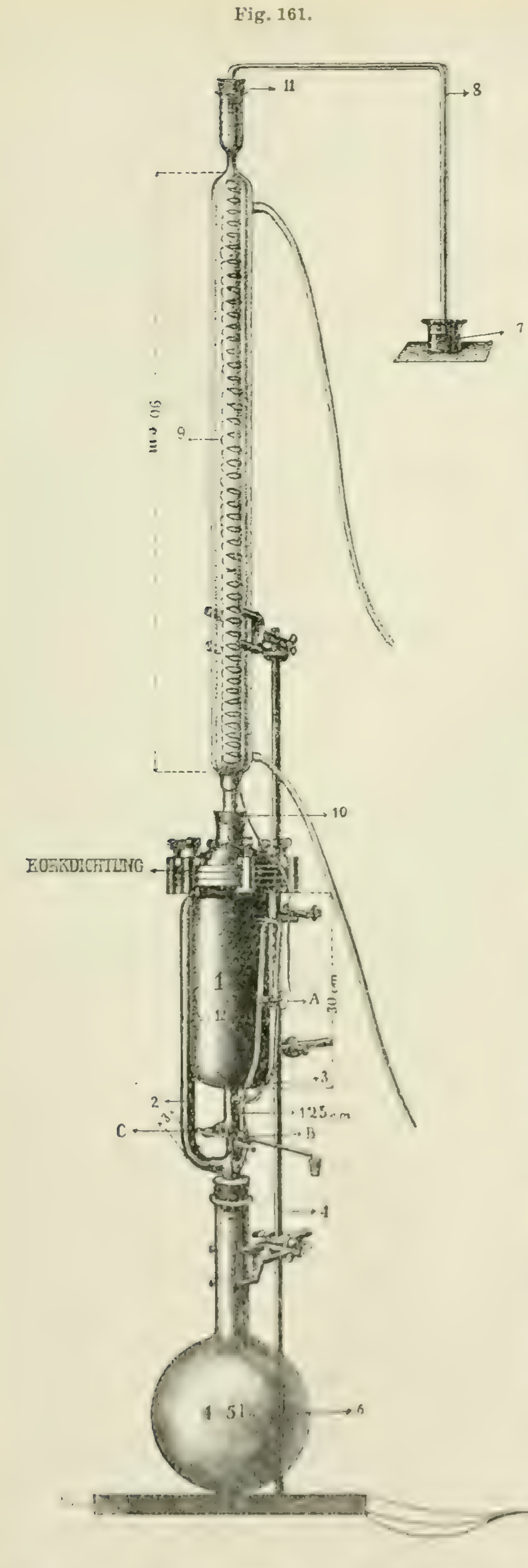
Außerdem verwenden wir nach Maßgabe der Versuche verschiedene tierische Organe, welche möglichst frisch zur Verarbeitung kommen können.

Das auf eine der beschriebenen Weisen getrocknete Gut extrahieren wir in großen metallenen Extraktionsapparaten (s. Fig. 161). Diese Extraktionsapparate fassen im Nutzraume zirka 2 *kg* Extraktionsgut. Auf einem Siebboden aus Zinn steht die Papierhülse aus schwedischem Filtrierpapier, in welche das gewogene Gut eingefüllt wird. Das Hauptextraktionsgefäß ist aus Kupfer, innen stark verzinnt, außen ist Quecksilberrot aufgetragen. Die Zuführungen

[1]) *Ivar Bang* l. c. p. 41.

[2]) *Rudolf Allers*, Zeitschr. f. d. gesamte Neurologie u. Psychiatrie. 5. 467 (1911).

Fig. 161.



Erklärung der Figur 161:

Hahn A, „ B, „ C } siehe Beschreibung.
1 Extrakteur.
2 Rohr für aufsteigende Extraktionsflüssigkeit.
3 Heberrohr.
4 Stativ.
5 elektrische Heizplatte.
6 Rundkolben aus Glas.
7 Schälchen mit Hg.
8 Glasrohr.
9 doppelt wirkender Kühler.
10 Korkstopfen.
11 „
12 Schrauben.

sind aus Zinnrohr, die Hähne aus Messing und äußerst genau eingeschliffen. Der Extraktionsapparat ist nichts anderes als ein großer Soxhletapparat. Das weitere Rohr für das aufsteigende Extraktionsmittel ist mit Isolierschnur gut isoliert, um die Kondensationen innerhalb dieses Rohres möglichst hintanzuhalten und darf nicht zu eng gewählt sein. In unserem Falle ist sein äußerer Durchmesser 2·5 *cm*. An dem Heber aus Zinn haben wir zwei neue Vorrichtungen angebracht (ich verdanke die Konstruktion dieses Apparates meinem früheren Assistenten Dr. *Walter L. Halle*).[1] Der Heber trägt in halber Höhe ein Verbindungsrohr und einen Hahn *A*. Wird der Hahn geöffnet, so funktioniert der Heber als kleiner Heber und es ist möglich, mit dem großen Apparat auch nur die Hälfte des Gutes, mit der Hälfte des sonst nötigen Lösungsmittels zu extrahieren. Außerdem ist am unteren Teile des Hebers ein Ablaufrohr mit einem Dreiweghahn *B* eingerichtet, welcher es ermöglicht, erstens jeweilig Proben zu entnehmen, so daß man untersuchen kann, ob das Extraktionsmittel noch etwas aufnimmt oder nicht, zweitens kann man bei diesem Auslauf, wenn man noch einen Kühler zuschaltet,

[1]) Noch nicht publiziert.

aus dem Kolben direkt die ganze Menge des Extraktionsmittels abdestillieren. Durch diese Anordnung hat sich die Zeitdauer der Extraktion bei vollgefülltem Extrakteur fast auf die Hälfte reduziert; der Grund liegt darin, daß die Heberwirkung häufiger als früher bei den normal konstruierten Apparaten eintreten kann. Bei diesen kommt es sehr oft vor und besonders, wenn man mit niedrig siedenden Extraktionsmitteln arbeitet, daß der Heber nicht in Aktion treten kann, weil der Auftrieb der Dämpfe dem Überdruck der Flüssigkeitsmenge im Extrakteur mindestens das Gleichgewicht hält. Man ist dann genötigt, die Heizung abzustellen und den Kolben, der den Extrakt aufnimmt, abzukühlen, was mühsam und zeitraubend ist. Der oben erwähnte Hahn *A* gestattet nun, durch einfaches Öffnen den Druck der Flüssigkeitssäule plötzlich bedeutend zu erhöhen, so daß der Heber zu ziehen beginnt. Man kann dann den Hahn schließen, ohne daß die Heberwirkung davon beeinflußt würde. Der modifizierte Soxhletapparat hat an seiner tiefsten Stelle einen großen Hahn *C*, durch welchen man eventuell zum Schluß alles Lösungsmittel in den Kolben ablassen kann. Dieser Hahn *C* spielt eine Rolle, wenn durch irgend einen Zufall das Heberrohr, beispielsweise durch Auskristallisieren der Substanz, verstopft wird. Der Deckel des Apparates ist mittelst einer Korkdichtung auf das Hauptstück zugepaßt und mit sechs Stellschrauben befestigt. Auf dem Deckel ist ein großer Schlangenkühler von über 1 *m* Länge und doppelten Kühlflächen aufgesetzt, der oben wieder mittelst Kork mit einem langen, nach abwärts gebogenen Glasrohr in Verbindung steht, das in ein Gefäß mündet, in welchem Quecksilber das Rohr sperrt. Der ganze Apparat wird auf einen großen Jenaer Rundkolben mittelst Kork dicht aufgesetzt. Diesen Rundkolben heizt man entweder mit einem elektrisch betriebenen Wasserbad oder auf einer großen elektrischen Heizplatte. Bei den elektrischen Bädern und Heizplatten muß man darauf sehen, daß die Umschaltungen nicht in der Nähe vom Heizkörper sind, sondern recht weit entfernt davon, damit nicht eventuell beim Umschalten Funken abspringen und zu einer Zündung Veranlassung geben. Alle Korke, welche genau passend und aus bestem, wenig porösem Material sein sollen, werden mit einem ziemlich wässerigen, dünnflüssigen Gipsbrei nach dem Einfügen überstrichen, um eine erhöhte Dichtigkeit zu erzielen. So bildet dieser Apparat ein völlig geschlossenes Ganzes, aus dem nur minimale Mengen von Lösungsmitteln bei dem Quecksilberverschluß entweichen können. Die Bruchgefahr ist eine geringe. Gegen den Siedeverzug geben wir entweder mit Petroläther gewaschene Holzspäne oder Glaskapillaren in den Kolben. Ist der Gang des Apparates einmal reguliert, so kann man ihn ohne weitere Beaufsichtigung trotz der großen Mengen feuergefährlicher Extraktionsmittel im Laboratorium laufen lassen. Große Vorsicht ist nur notwendig bei der Befestigung des Kolbens, um einen Bruch desselben zu verhüten, welcher natürlich dann, wenn Feuer in der Nähe wäre, zu einem Brande Veranlassung geben könnte.

Acetonextraktion.

Die hier zu schildernde Art der Extraktion habe ich anderweitig schon, wenn auch nicht in der hier geschilderten, ausgebildeten und modifizierten Form als die Methode der fraktionierten Extraktion beschrieben, eine Methode, welche es ermöglicht, schon bei der Extraktion die verschiedenen Gruppen von Substanzen möglichst von einander durch Anwendung passender Extraktionsmittel zu scheiden.[1])

Wir führen aus Gründen, die ich anderweitig schon entwickelt habe, bei Gehirn besonders zuerst die Extraktion mit Aceton durch. Für die Wahl dieses Lösungsmittels treten wir aus mehreren Gründen ein. Vor allem extrahiert Aceton sehr gründlich die Gewebe, indem es alles Cholesterin auflöst, ebenso alle Cholesterinester und dann auch die acetonlöslichen Phosphatide. Es ist für jeden in der Gewebechemie Erfahrenen von vornherein verständlich, daß bei einer solchen Extraktion auch andere, in diesem Lösungsmittel sonst nicht lösliche Substanzen bei der ersten Extraktion mitgeführt werden und daß eine weitere Reinigung von diesen unter allen Umständen notwendig sein wird, denn es handelt sich dann nicht um eine Lösung in Aceton, sondern um eine Lösung in einer acetonigen Cholesterinlösung etc. In Wirklichkeit gehen sehr wenig acetonunlösliche Phosphatide mit in den warmen Aceton hinein. Hingegen ist es sehr schwer, Cholesterin völlig mit Aceton aus Hirn zu extrahieren und ganz kleine Mengen findet man dann noch immer bei der Aufarbeitung der Kephalinfraktion (s. d.).

Wollte man mit kaltem Aceton die großen Mengen von Cholesterin aus dem Gehirn extrahieren, so würde man eine sehr lange Zeit und sehr viel Aceton benötigen. Wir ziehen es nach unseren bisherigen Erfahrungen vor, auf dem oben beschriebenen Extraktionsapparat mit Aceton zu extrahieren, der im Extrakteur etwa Körpertemperatur hat. Es schwankt die Temperatur im Extraktionsgefäß natürlich sehr, je nach der Temperatur im Laboratorium. Warmes Aceton nimmt aus dem Gehirne die großen Massen von Cholesterin leicht auf, aber mit dem Aceton geht ein acetonlösliches Phosphatid mit, welches man sowohl in den acetonigen Mutterlaugen findet, nachdem das Cholesterin auskristallisiert ist, als auch in den alkoholischen Mutterlaugen des Cholesterins. Aber es ist nicht gerade leicht, das Cholesterin völlig von dem Phosphatid zu befreien. Bei den großen Mengen von Cholesterin, mit denen wir es zu tun haben, hat es sich manchmal bewährt, das Cholesterin, nachdem es roh aus dem Aceton auskristallisiert war, mit Wasser zu waschen und dann erst dem Umkristallisieren zuerst aus Aceton, später aus 85%igem Alkohol zu unterwerfen. Einigemal haben wir die uns von *Julius Mauthner* empfohlene Methode, vorerst aus Eisessig und dann erst aus 85%igem Alkohol zu kristallisieren, angewendet und gute Erfolge erzielt. In den acetonigen Mutterlaugen findet sich das von uns mit *Herbert*

[1]) *Sigmund Fränkel*, Über Lipoide. VI. Mitteilung. Über ein neues Verfahren der fraktionierten Extraktion der Gehirnlipoide. Biochem. Zeitschr. **19**. 254 (1909).

Elias[1]) beschriebene Phosphatid Leukopoliin, welches Kohlenhydratreaktionen nach der Spaltung gibt, aber dieser Kohlenhydratspaltling ist keine Galaktose und reagiert nicht mit Hydrazinen. Es dürfte sich anscheinend um eine vielleicht stickstoffhaltige Kohlenhydratsäure handeln. Die weitere Untersuchung wird erst Klarheit über die Natur dieser Substanz bringen.

In den Aceton gehen außer diesen zwei Hauptsubstanzen noch kleine Mengen schmieriger Körper hinein und auch anderer färbender Substanzen, wahrscheinlich auch organische Salze etc., welche man durch die Wasserbehandlung zum größten Teil entfernen kann. Der Acetonextrakt des menschlichen Gehirnes enthält der Hauptsache nach an Lipoiden nur freies Cholesterin und Leukopoliin.

Petrolätherextraktion.

Nachdem man sich überzeugt, daß Aceton im Extraktionsapparat nichts mehr aufnimmt, geht man zur Extraktion mittels Petroläther über. Die früheren Untersucher haben ausschließlich mit Äther gearbeitet. Wir haben aus mehreren Gründen den Äther vermieden. Äther sowie Petroläther nehmen der Hauptsache nach nach unseren Befunden nur die ungesättigten Phosphatide auf. Äther ist aber, wenn man ihn nicht ganz rein und frisch destilliert für die Extraktion verwendet, bekanntlich eine stark oxydierende Substanz, dabei bei weitem teurer und durchaus nicht bei großen Massen ungefährlicher als der von uns vorgeschlagene und verwendete Petroläther. *J. Parnas*[2]) hat unsere Methodik zu modifizieren gesucht, indem er ohne vorher mit Aceton zu erschöpfen, Benzin angewendet. Er bringt das viele Cholesterin nun in die Benzinfraktion hinein. Ferner ist das eine bedeutende Verschlechterung des Verfahrens auch nach der Richtung hin, daß es nämlich durchaus nicht gleichgiltig ist, welche von den Petrolbenzinfraktionen man für die Extraktion anwendet. Schon niedrig siedender Petroläther nimmt ebenso wie Äther während der Extraktion die weißen Substanzen der gesättigten Gruppe mit, welche sich im Extraktionsgefäß am Boden des Lösungsmittels ansammeln, insbesondere, wenn das Lösungsmittel erkaltet ist. Nimmt man aber höhere Fraktionen der Petroleumkohlenwasserstoffe, so werden immer mehr und mehr von der gesättigten Gruppe mitgenommen und gelöst, denn mit Ligroin z. B. kann man die gesättigten Substanzen völlig aus dem Gehirn herausholen, was wir auch mit Vorteil benützen. Will man daher nach unserem Vorschlag tatsächlich eine Methode der fraktionierten Extraktion anwenden, das heißt schon während der Extraktion durch passende Wahl und passende Aufeinanderfolge der Lösungsmittel eine Trennung der drei großen Gruppen der Lipoide, wie wir sie vorgeschlagen haben: des Cholesterins und seiner Derivate, der ungesättigten Phosphatide und der gesättigten Phosphatide, Sulfatide und phosphor-

[1]) *Sigmund Fränkel* und *Herbert Elias*, Über Leukopoliin. Biochem. Zeitschr. 28. 320 (1910).

[2]) l. c.

und schwefelfreien Sphingogalaktoside durchführen, so verwende man leicht siedenden Petroläther. Nach unseren Erfahrungen ist es am besten, einen Petroläther zu verwenden, dessen höchste Fraktion bei 55° übergeht. Der käufliche Petroläther entspricht diesen Anforderungen durchaus nicht. Wir raffinieren ihn daher durch Umdestillieren mit einem Fraktionieraufsatz und entnehmen dem käuflichen nur so viel, bis das Thermometer auf 55° ansteigt. Der große übrigbleibende Rest wird für andere Zwecke verwendet. Auf diese Weise erhalten wir nur sehr wenig von der gesättigten Fraktion in den Extrakt der ungesättigten Phosphatide. Ist die Extraktion beendet, so wird nach gutem Auskühlen des Petroläthers die Hauptmasse der petrolätherischen Lösung in einem Fraktionierkolben abfraktioniert, der Rest mit der kleinen Menge gesättigter Substanzen wird auf einem kleinen Filter filtriert. Am besten verwendet man schwedische Filter, welche dieses allerfeinste Pulver ebenso wie Barytfilter zurückzuhalten vermögen. Die petrolätherische Lösung wird nun einfach destilliert; wenn der größte Teil des Petroläthers abdestilliert ist und das Thermometer gegen 40° ansteigt, destilliert man unter Anwendung von Vakuum weiter, und zwar vom Vakuum der Wasserstrahlpumpe, da sonst die Leitungen der Kolbenpumpen zu sehr vom Petroläther trotz stärkster Kühlung angefüllt werden.

Scheidung des Petrolätherextraktes.

Alkoholunlösliche Fraktion der ungesättigten Phosphatide: Kephalin.

In den stark konzentrierten Extrakt gießt man hierauf etwa die vierfache Menge absoluten Alkohols und rührt stark um. Im ersten Moment fällt das Kephalin, welches die Hauptmasse des Extraktes bildet, als eine noch flüssige, und zwar sehr dickflüssige Masse, zu Boden. Man rührt sehr stark mit dicken Glasstäben um und nachdem sich die alkoholische Lösung geklärt, kann man diese dekantierend abgießen. Hierauf gießt man nochmals absoluten Alkohol auf das gefällte Kephalin, rührt wieder stark um, wobei sich dieses in eine feste, fast wachsartige Masse verwandelt. Zur Reinigung wird diese Masse nach sorgfältigem Abgießen und Abpressen des Alkohols mit einem Pistill wieder in möglichst wenig leicht siedendem Petroläther unter starkem Rühren gelöst. Sollte die Lösung nicht ganz klar sein, so schleudert man diese auf einer Zentrifuge aus. Hierauf gießt man die klare Lösung in dünnem Strahle in etwa die 2—3fache Menge absoluten Alkohols, rührt sie gut um, läßt absitzen, dekantiert die Lösung und behandelt den Niederschlag wiederholt unter starkem Kneten mit absolutem Alkohol, bis dieser fast farblos abläuft. Wird ein solches Präparat nun im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, so erhält man es nach wenigen Tagen schon als eine stark rissige Masse, die man mit dem Spatel leicht zerteilen und dann nach wiederholtem Trocknen in ein feinstes, leicht gelbes Pulver verwandeln kann.

Beim Kephalin ist, wie bei keiner anderen Substanz, möglichst rasches Arbeiten und möglichst rasches Entfernen der Lösungsmittel notwendig, da

man statt einer leicht gelb gefärbten Masse eine schwarze Substanz infolge der Oxydation erhält. Das so gewonnene Kephalin ist durchaus noch keine chemisch reine Substanz. Vor allem enthält es, wie alle Beobachter übereinstimmend gefunden haben, in rohem Zustande noch verschiedene Aschenbestandteile. Schon *Thudichum* hat vorgeschlagen, das nach seiner Methode dargestellte Kephalin über Wasser zu reinigen[1], und in unseren Untersuchungen mit *E. Neubauer*[2]) haben wir tatsächlich für die Elementaranalysen Kephalin über Wasser gereinigt, indem wir es in diesem durch feines Verreiben zur Quellung brachten, abschleuderten und mit Säure fällten. Diese Reinigungsmethode ist keineswegs eine ideale. Man verliert sehr viel von der Substanz, um zu Präparaten zu gelangen, welche stimmende Analysenzahlen geben. Dem Umstande, daß die Reinigung des Kephalins schwierig ist, ist es zuzuschreiben, daß im *F. Hofmeister*schen Laboratorium von *F. Falk*[3]) das Gehirnkephalin zuerst als Diaminomonophosphatid beschrieben wurde, entgegen den Angaben von *Thudichum* und daß erst, nachdem wir mit *E. Neubauer*[2]) das in der beschriebenen Weise gereinigte Kephalin analysiert und genaue Zahlen für ein Monoaminomonophosphatid erhalten haben, *J. Parnas* nachher im Straßburger Laboratorium zu gleichem Resultate wie wir gelangen konnte.[4])

Alkohollösliche Fraktion der ungesättigten Phosphatide.

Die alkohollösliche Fraktion wird nun im Vakuum stark eingeengt und hierauf wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen, wobei sich manchmal noch kleine Mengen einer Substanz, die wahrscheinlich mit Kephalin identisch ist, ausscheiden. Die alkoholische Lösung gibt, wie schon *Thudichum* beobachtet hat, mit einer schwach ammoniakalischen alkoholischen Bleiacetatlösung einen Niederschlag. *Thudichum* hat diesen Niederschlag weiter untersucht und aus demselben eine phosphor- und stickstoffhaltige Substanz, das Myelin, sowie eine verwandte: das Paramyelin gewonnen. Bei unseren Untersuchungen mit *Richard Dörr*[5]) haben wir den Bleiniederschlag nach Auswaschen mit Alkohol in Benzol gelöst, und aus der benzoligen Lösung wieder mit Alkohol gefällt. Als wir aber die Bleiverbindungen hierauf in alkoholischer Suspension in der Wärme mit Schwefelwasserstoff behandelten, erhielten wir eine kristallisierende Substanz mit sauren Eigenschaften, welche sich als völlig frei von Phosphor und Schwefel erwies, aber stickstoffhaltig war und ungesättigten Charakter zeigte. Die Untersuchung dieser Substanz sowie die Ermittlung ihrer Spaltungsprodukte ist noch nicht beendet.

Thudichum hat vorgeschlagen, das im Überschuß zugesetzte Blei mit Schwefelwasserstoff aus dem alkoholischen Filtrat zu entfernen, was wir aus dem

[1]) l. c. p. 129, 130.

[2]) *S. Fränkel* u. *E. Neubauer*, Über Kephalin. Biochemische Zeitschr. **21**. 321 (1909).

[3]) *Fritz Falk*, Zur Kenntnis des Kephalins. Biochemische Zeitschr. **16**. 187 (1908).

[4]) *Jakob Parnas*, Über Kephalin. Biochemische Zeitschrift. **22**. 411 (1910).

[5]) Noch nicht veröffentlicht.

Grunde vermeiden, weil das Schwefelblei meist kolloidal ausfällt und kaum zu entfernen ist. Es ist viel sauberer und einfacher, das Blei als Chlorblei abzuscheiden, indem man tropfenweise eine absolut alkoholische Salzsäure zu der bleihaltigen Lösung zusetzt, bis gerade Kongopapier äußerst schwach blau wird. Der Niederschlag von Chlorblei resp. Chlorbleiammoniak setzt sich sehr gut ab und kann leicht abfiltriert werden. Man filtriert nun, engt die Lösung im Vakuum wieder ein, nachdem man mit einer Spur alkoholischen Ammoniaks die Spur freier Salzsäure abgestumpft hat. Die konzentrierte Lösung wird nun mit reinem, wasserfreiem Aceton ausgefällt, wieder in Alkohol gelöst und wieder mit Aceton gefällt. Aus dem so dargestellten Präparat haben wir dann als Chlorcadmiumverbindung das Sahidin gewonnen. In den Mutterlaugen des Sahidins fanden wir kaum Spuren von anderen Substanzen. Dieses Sahidin erwies sich als nicht identisch mit Ovolecithin.[1])

Ich möchte an dieser Stelle eine Bemerkung über die Verwendung von Cadmiumsalzen in der Analyse der Phosphatide einschalten. Unsere Kenntnisse über die Lecithingruppe beruhen, wie jeder, der sich nur ein wenig in der Literatur dieser Verbindungen zurechtgefunden, weiß, auf der Analyse der Platinverbindung von *Strecker* und auf den Analysen der Cadmiumverbindungen vieler Autoren, insbesonders von *Strecker* und *Thudichum*. Einiges Mißtrauen gegenüber der Verwendung von Cadmiumsalzen erregten Mitteilungen von *Erlandsen*, welcher angibt, daß die Chlorcadmiumfällungen nicht quantitativ sind, teilweise weil es alkohollösliche Stoffe gibt, welche von Chlorcadmium gefällt werden, die jedoch keine Phosphatide sind und weil auch die Cd-Verbindungen in bezug auf die C- und H-Zahlen andere Resultate geben, als die freien Substanzen, während die N- und P-Werte nicht differieren. Wir haben bei Verwendung von Chlorcadmium bei den Hirnphosphatiden, das wir lediglich bei Sahidin und Leukopoliin benutzt, n i c h t die g l e i c h e n Erfahrungen gemacht, können aber davor nur warnen, wahllos in Phosphatidgemische, wie „Lecithin", Cadmiumlösung hineinzuschütten und aus der Analyse „Schlüsse über die Zersetzung" zu ziehen, wie es kritiklos *W. Heubner*[2]) tut.

Die gesättigte Gruppe.

Wenn man Hirn mit Aceton und Petroläther oder mit Petroläther allein oder auch mit Äther erschöpft hat, so hinterbleibt in diesem eine Gruppe gesättigter Substanzen, welche man mit verschiedenen Lösungsmitteln, am besten in der Siedehitze derselben, extrahieren kann, und die beim Erkalten sich meist kristallisiert aus dem Lösungsmittel abscheiden. Die Substanzen, welche man auf diese Weise erhält, hat man vor mehr als 100 Jahren schon beobachtet und sie matière blanche genannt. Ursprünglich hat man sie noch mit Cholesterin verunreinigt erhalten, aber die späteren Forscher

[1]) *S. Fränkel* u. *Kurt Linnert*, Über Sahidin. Biochem. Zeitschr. **24**. 268 (1910).
[2]) *W. Heubner*, Beobachtungen über die Zersetzlichkeit des Lezithins. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol. **59**. 420 (1908).

haben diese weiße Substanz mit Äther gereinigt und sie so sicherlich cholesterinfrei bekommen. Diese weiße Substanz der französischen Forscher tauchte dann, in jedenfalls nicht reinerem Zustande, in Deutschland unter dem Namen Protagon auf. Alle Forscher haben diese Substanz in der Weise dargestellt, daß sie Hirne, eventuell nach vorherigem Trocknen, mit siedendem Alkohol — entweder mit absolutem oder mit 85%igem — auskochten oder bei 45° ausholten und die weißen Absätze dann durch Kristallisation reinigten. Gegen die Annahme, daß dieses Protagon ein einheitlicher Körper sei, haben zahlreiche Untersucher mehr oder weniger berechtigte Einwände erhoben. Die eine Gruppe behauptete, daß dieses Protagon eine Mischung von Cerebrosiden und Lecithin sei, was sicher unrichtig ist, da Lecithin nach dem Ausäthern gar nicht mehr darin vorkommen kann, während andere Forscher Trennungen mit mehr oder weniger eingreifenden Mitteln vornahmen und einen phosphorhaltigen und einen phosphorfreien Anteil erhalten konnten. Insbesondere *Thudichum* hat das große Verdienst, darauf hingewiesen zu haben, daß man phosphorfreie Substanzen und phosphorhaltige im sogenannten Protagon unterscheiden muß.

Hingegen haben andere Forscher an der einheitlichen Natur des Protagons festgehalten. So insbesondere *Gamgee*[1]), sowie *A. Kossel* und *Freytag*[2]) und in letzter Zeit entgegen allen Einwänden *W. Cramer*.[3]) Letzterer isolierte sein Protagon, indem er zuerst die Hirnmasse mit 96%igem Alkohol in einer Schüttelmaschine verarbeitete und dann im Eisschrank absetzen ließ. Nach 3—4 solchen Extraktionen wurde mit Äther so lange geschüttelt, bis Lecithin und Cholesterin völlig entfernt waren. Hierauf wurde der ungelöste Rückstand an der Luft von Äther befreit und die braune resultierende Masse leicht in feines Pulver verwandelt, aus dem nach der Methode von *Gamgee* mit warmem Alkohol, sowie mit siedendem absoluten Alkohol extrahiert wurde. Bei letzterem Verfahren wurde der siedende absolute Alkohol auf das Pulver gegossen und die Mischung 1 bis 2 Minuten im Wasserbad unter Schütteln belassen und die Lösung nach *Cramer* durch einen Heißwassertrichter in ein eisgekühltes Gefäß filtriert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt und das rohe kristallinische Produkt mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Für die Rekristallisation goß er siedenden absoluten Alkohol auf das Protagon, kochte ca. 1 Minute und filtrierte. Das so dargestellte Produkt erwies sich in bezug auf Refraktion und spezifische Drehung bei allen Darstellungen aus Ochsenhirn als identisch. Dieses veranlaßt *Cramer*, das Protagon für eine einheitliche Substanz zu halten, während er die gegenteiligen Resultate, insbesondere der amerikanischen Kollegen, *Posner* und *Gies*[4]), in der Weise er-

[1]) *Gamgee*, Textbook of physiological chemistry. London, p. 427 (1880); *A. Gamgee* und *E. Blankenhorn*, Protagon. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **3**. 360 (1879).

[2]) *A. Kossel* und *H. Freytag*, Nervenmark. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **17**. 431 (1893.)

[3]) *W. Cramer*, Journal of physiology, **31**. 31 (1904); *A. C. Lochhead* und *W. Cramer*, Biochemical Journal. **2**. 350 (1907).

[4]) *E. R. Posner* und *W. J. Gies*, Protagon. Journ. of biol. chemistry. **1**. 59 (1905).

klärt, daß die wechselnden Phosphormengen beim Umkristallisieren der Präparate einer Hydrolyse zuzuschreiben sind, indem das eigentliche Protagon bei längerer Einwirkung von siedendem Alkohol sich zersetzt.

Die anderen Untersucher hingegen haben eine Reihe von Methoden angegeben, um aus diesem Protagon sowohl phosphorhaltige als auch insbesondere phosphorfreie Substanzen zu gewinnen. Das größte Verdienst nach dieser Richtung hin ist *Thudichum* zuzuschreiben, welcher zwei solche phosphorfreie Substanzen isoliert und beschrieben hat, von denen er auch die Konstitution zum Teil feststellen konnte. Er benannte sie Phrenosin und Kerasin. Andere Forscher nannten diese phosphorfreien Substanzen Cerebroside, aber wie ich glaube, haben auch diese Forscher die Cerebroside nicht in einem reineren Zustande in Händen gehabt als *Thudichum*. Erst als *Gamgee* [1]) und *Thierfelder* [2]) das sogenannte Pseudocerebrin oder Cerebron kristallisiert erhielten und *Thierfelder* [3]) die Hydrolyse durchführte, welche bis auf einen Punkt identische Resultate mit *Thudichums* [4]) Hydrolyse des Phrenosin gab, konnte man von einer reinen isolierten Substanz sprechen. Man mußte die Frage aufwerfen, warum die verschiedenen Forscher — und wir zählen die ersten Namen unserer Wissenschaft dazu — so verschiedene Resultate erhielten und an welchem Punkte ihre Methodik scheiterte? Wenn man die Verfahren, welche *Thierfelder* zur Isolierung des Cerebrons immer wechselnd veröffentlicht hat, betrachtet und sieht, mit welchen Schwierigkeiten er zu kämpfen hatte und erst nach wievielfachem Umkristallisieren er aus dem phosphorfreien Gemenge Cerebron isolierte, so wird man Folgendes darüber aussagen können. Die Cerebroside oder, wie ich sie benannte, die Sphingogalaktoside geben sehr wechselnde Stickstoffzahlen, welche immer höher liegen als die Stickstoffzahl des reinen Cerebrons, sowie seiner aus den Spaltungsprodukten berechneten theoretischen Formel. Es muß daher in großer Menge eine zweite Substanz, mindestens e i n e, neben dem Cerebron vorhanden sein, welche mit dem Cerebron gemischt, physikalisch ähnliche Eigenschaften zeigt und auch sehr nahe verwandte oder identische Spaltungsprodukte gibt. So hat von all den analysierten Cerebrosiden verschiedener Darsteller nur das Cerebron so niedrige Stickstoffzahlen. Es ist gar kein Zweifel, daß Cerebron kein Spaltling ist, sondern direkt im Gehirn vorkommt, und nach unseren Untersuchungen besteht kein Zweifel, und darin stimmen wir mit *Posner* und *Gies* überein, daß *Thudichums* Phrenosin mit dem Cerebron identisch ist, aber *Gamgee* und *Thierfelder* haben entschieden das Verdienst, daß sie diese Substanzen in weitaus reinerem Zustande in Händen hatten; man kann *Thierfelders* Verdienst nicht bestreiten, gezeigt zu haben, daß die Fettsäure, um die es sich handelt, nicht Stearinsäure, wie *Thudichum* und wie auch

[1]) *Gamgee*, Textbook of physiological chemistry. London. p. 441 (1880).

[2]) *H. Thierfelder* und *E. Wörner*, Gehirn. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **30**. 542 (1900).

[3]) *H. Thierfelder*, Cerebron. Zeitschr. f. physiol. Chemie. **43**. 21 (1904/5), ibid. **44** 366 (1905), ibid. **46**. 518 (1905), ibid. **49**. 286 (1906).

[4]) l. c. p. 182 ff.

Kossel angenommen haben, ist, sondern eine Oxysäure, die Cerebronsäure. Es ist nun die Frage, was ist denn das eine oder die mehreren anderen Cerebroside, welche vom Cerebron so schwer trennbar sind?

Fernerhin hat man die Frage aufgeworfen, was die phosphorhaltigen Anteile dieser weißen Materie sind. Mehrere Forscher, insbesondere aber *Kossel* und *Freytag* haben darauf hingewiesen, daß in dieser weißen Materie neben Phosphor auch größere Mengen Schwefel vorhanden sind, und zwar in Form von Schwefelsäure. *Thudichum* selbst erwähnt nur nebenbei solche Sulfatide, ohne besonderen Wert darauf zu legen und hat nur ein Phosphatid als Cadmiumsalz isoliert und als Sphingomyelin beschrieben. Viele Forscher haben den Schwefelgehalt entweder geleugnet oder nur wenig Schwefel gefunden. Wir haben in allen unseren Präparaten ohne Ausnahme neben Phosphor auch Schwefel gefunden. Man muß nun fragen, ob der phosphorhaltige Anteil ein gesättigtes Phosphatid ist und daneben ein Sulfatid vorkommt, oder ob es sich um ein Phosphorsulfatid als Individuum handelt. Die Methodik der Verarbeitung dieser weißen Materie muß daher so eingerichtet sein, daß sie allen diesen aufgeworfenen Fragen gerecht wird und daß man jedenfalls dazu kommt, Substanzen darzustellen, und zwar in solchen Mengen, daß man an ihre Hydrolyse gehen kann, da die bloße Analyse so komplizierter Gebilde, wenn sie auch rein dargestellt sind, vorläufig nichts besagt, ebensowenig wie etwa beim Eiweiß, solange wir nichts über die Spaltlinge aussagen können.

Die Methoden der Trennung des phosphor- und schwefelhaltigen Anteiles der gesättigten Gruppe von den Cerebrosiden sind um so mannigfaltiger, als alle Forscher auf diesem Gebiete sehr große, fast unüberwindliche Schwierigkeiten fanden. *Thudichum* hat die weiße Materie mehrfach aus Alkohol umkristallisiert und so den Phosphorgehalt bis auf 0·8% heruntergedrückt. Die weitere Reinigung führte er nach einer Methode durch, die wir die Bleimethode nennen wollen.

Die feuchte weiße Materie wird im Mörser mit einer alkoholischen Bleizuckerlösung, welche kleine Mengen von Ammoniak enthält, zerrieben und in heißen 85%igen Alkohol eingetragen. Dann setzt man noch weiter Bleizucker und Ammoniak der heißen Lösung zu, so lange noch ein Niederschlag entsteht. Man filtriert heiß und kocht den Bleiniederschlag erschöpfend mit Alkohol aus. Die in heißem Alkohol gelöst gebliebenen Cerebroside fallen beim Abkühlen aus und werden aus absolutem Alkohol umkristallisiert, wobei zuerst Phrenosin ausfällt, später Kerasin. In der Mutterlauge ist noch Sphingomyelin und Kerasin enthalten, die durch Cadmiumchlorid trennbar sind, da nur das Sphingomyelin eine Cadmiumverbindung gibt. Das rohe Phrenosin wird durch fraktionierte Kristallisation vom Kerasin befreit, und zwar in der Weise, daß die alkoholische Lösung zwischen 50° und 40° Phrenosin in Rosetten auskristallisieren läßt. Die Bildung dieser Rosetten hört bei 28° auf und die über denselben stehende Flüssigkeit bleibt klar, bis sie auf 26° ausgekühlt ist. Dann fällt das Kerasin als dichte gelatinöse Wolke aus. Das Phrenosin wird durch 8maliges

Umkristallisieren kerasinfrei gewonnen. Das so gewonnene Phrenosin war aber noch nicht frei von Phosphatiden. Um es von diesen völlig zu reinigen, wurde Phrenosin mit Chlorcadmium versetzt, das letztere durch Schwefelwasserstoff zerlegt und die ganze Mischung mit großen Mengen Äther behandelt. Die gelbe Phosphatid-Schwefelcadmiumverbindung löst sich in Äther auf und wird abfiltriert, während das Phrenosin ungelöst bleibt. Man löst nun das Phrenosin in heißem Alkohol, filtriert vom Schwefelcadmium und kristallisiert abermals. So gereinigte Präparate enthielten aber noch immer $^1/_2$ bis ein ganzes Prozent Phosphatid, welches die Elementaranalyse stark beeinflußt. *Thierfelder* hat die Trennung von Cerebron und Phosphatiden auf eine andere Weise ausgeführt, die aber nach seinen zahlreichen Angaben und nach unserer Nachprüfung auch nicht völlig gute Resultate liefert. Er entwässert[1]) Gehirn mit Aceton und extrahiert mit Äther. Bei 0° kristallisiert aus dem Äther eine weiße Masse aus, welche man dem Gehirnbrei zufügt und das Ganze wird mit 85%igem Alkohol bei 45° bis 50° wiederholt ausgezogen. Die ausfallenden Massen wäscht man mit Äther, trocknet und löst in Methylalkohol, welcher 75% Chloroform enthält. Auf einen Teil der weißen Materie nimmt man 5 Teile des Lösungsmittels und löst unter leichtem Erwärmen, filtriert und läßt verschlossen stehen. Es scheidet sich an der Oberfläche eine weiße Masse ab, ebenso aus dem ausgekühlten Filtrat. Durch wiederholtes Umkristallisieren erhält man eine harte weiße Kruste, welche sich an der Oberfläche abscheidet. Alle Abscheidungen, auch die aus der Mutterlauge, werden vereinigt und in der 30fachen Menge eines Lösungsmittels, bestehend aus 1 Teil Chloroform und 4 Teilen Methylalkohol, heiß gelöst. Die auskristallisierende Masse wird mit einem Zinkreagens behandelt. Man erhält dieses durch Suspendieren von Zinkhydroxyd in Methylalkohol, Einleiten von Ammoniak und Zufügen von Ammoniumacetat. Man löst das Cerebron heiß in Methylalkohol, welcher 10% Chloroform enthält, setzt das Reagens zu und kocht, bis sich eine flockige Masse ausscheidet, welche fast alle phosphorhaltigen Substanzen enthält. Hierauf filtriert man. Das sich ausscheidende Cerebron kristallisiert man noch einmal aus der Chloroformmethylalkoholmischung um. In seiner jüngsten Arbeit gibt *Thierfelder*[2]) an, daß er neben dem Cerebron eine dem Cerebron sehr ähnliche und schwer von ihm abtrennbare Substanz gefunden. Er arbeitet bei der Darstellung des Cerebrons gegenwärtig in der Weise, daß er die fein zerhackte Hirnmasse auf Glasplatten in dünner Schicht aufträgt. Die Platten liegen auf einer mit dicker Sandschicht bedeckten Eisenplatte und werden durch unterstellte Brenner so erwärmt, daß die Temperatur des Sandes an keiner Stelle 50° bis 53° übersteigt. Ein über den Platten angebrachter Flügelventilator sorgt für rasche Erneuerung der Luft. In den ersten drei Stunden wird die Masse etwa alle

[1]) *K. Kitagawa* und *H. Thierfelder*, Über das Cerebron. Zeitschr. f. physiol. Chem **49**. 286 (1906).

[2]) *Hermann Löhnung* und *H. Thierfelder*, Über das Cerebron. IV. Mitteilung Zeitschr. f. physiol. Chem. 68. 464 (1910).

10 Minuten mit einem Spatel gewendet, dann seltener. Nach 10 Stunden hat sie eine Wassermenge, welche zwischen 72 und 75% des Gewichtes des frischen Gehirns schwankt, abgegeben und eine helle Fleischfarbe angenommen, sie verbleibt nun noch längere Zeit im Exsikkator und wird darauf im *Soxhlet*schen Extraktionsapparat mit Äther ausgezogen, und zwar unter zweimaligem Wechsel des Äthers je 3—4 Stunden. Die in den ätherischen Lösungen erfolgenden Abscheidungen trennt man auf der Zentrifuge, zerteilt den Bodensatz in frischem Äther, zentrifugiert wieder und wiederholt die Behandlung nochmals für den Fall, daß der Äther noch gefärbt ist. Nach einem, wie die Verfasser angeben, unendlich mühsamen Verfahren verarbeiten sie nun die so erhaltene weiße Masse. Nur die Grundzüge des Verfahrens sind veröffentlicht. Zunächst erfolgt eine 6mal wiederholte Umlösung aus 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol. Hierauf werden die weißen Massen in großen Mengen heißen, den fünften Teil Chloroform enthaltenden Methylalkohols gelöst und die beim Abkühlen innerhalb gewisser Temperaturgrenzen erfolgenden Abscheidungen mittelst Filtrierens durch Warmwassertrichter voneinander getrennt. Auf diese Weise trennen sich die kristallisierenden Anteile von den später ausfallenden amorphen. Eine weitere Trennung innerhalb der so gewonnenen Fraktionen läßt sich durch wiederholte Extraktion mit 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol und weiterhin mit Methylalkohol bei 50° erzielen. So konnten *Löhmung* und *Thierfelder* Cerebron und die amorphe Substanz trennen. Aber sie können nicht angeben, ob diese amorphe Substanz nicht etwa verunreinigtes Cerebron ist oder ob es sich um einen von den übrigen Forschern schon beobachteten Körper handelt.

Bei unseren zahlreichen Untersuchungen haben wir schließlich zu einer Methodik gegriffen, die wir als den Ausbau eines schon von *Kossel* und *Freytag*[1]) beschriebenen Verfahrens angesehen haben wollen. Man hat früher die Cerebroside in der Weise gewonnen, daß man die Gehirnsubstanz mit siedendem Barytwasser versetzt und aus dem abgeschiedenen Gemisch die Cerebroside mit Alkohol auszog. *Kossel* und *Freytag* lösten Protagon (die weiße Materie) in Methylalkohol und versetzten die Lösung bei Wasserbadtemperatur mit einer methylalkoholischen Lösung von Ätzbaryt, wobei sich sofort ein voluminöser Niederschlag bildete. Nach dem Digerieren der Flüssigkeit einige Minuten lang auf dem Wasserbade trennt man den Niederschlag ab, wäscht ihn mit barythaltigem Methylalkohol einmal, zerteilt ihn hierauf in Wasser und zerlegt die Barytverbindung mit Kohlensäure, filtriert hierauf den Niederschlag ab, wäscht ihn mit Alkohol und zieht ihn sodann bei 50° mit absolutem Alkohol aus, wobei nach den Angaben der beiden Forscher die Verunreinigungen, welche sonst den Cerebrosiden hartnäckig anhaften, insbesondere die Barytseifen der höheren Fettsäuren, nur zu geringem Teil in Lösung gehen. Die letzten Reste baryt-

[1]) *A. Kossel* und *Fr. Freytag*, Über einige Bestandteile des Nervenmarks und ihre Verbreitung in den Geweben des Tierkörpers. Zeitschr. f. phys. Chem. **17**. 431 (1893).

haltiger Verbindungen werden entfernt, indem man sie zunächst anreibt und wieder mit Kohlensäure länger behandelt. Den abgetrennten Niederschlag nimmt man mit absolutem Alkohol bei 50° auf. Aus dem Alkohol kristallisiert bei Zimmertemperatur zunächst Cerebrin („Cerebrin" ist wohl identisch mit *Thudichums* Phrenosin), nach 2 Stunden vorwiegend Kerasin und durch 8maliges Umkristallisieren aus Alkohol kann man diese beiden Substanzen voneinander trennen. *Kossel* und *Freytag* haben aber den in Alkohol unlöslichen Rückstand, welcher die Phosphatide und Sulfatide enthalten muß, in ihrer Untersuchung nicht weiter berücksichtigt.

Wir haben durch den Ausbau dieser Methodik, die nach unseren Erfahrungen durchaus die beste und einfachste ist und weitaus allen übrigen, insbesondere den *Thierfelder*schen mühseligen und kaum literarisch darstellbaren Verfahren überlegen ist, jedenfalls bis jetzt bei der weiteren Trennung die besten Erfolge gehabt. Wie oben angegeben, extrahieren wir die mit Aceton und Petroläther völlig erschöpften Gehirne mit siedendem absolutem Alkohol. Nach dieser Extraktion finden wir in den Rückständen des Gehirns nur mehr minimale Mengen mit Lösungsmitteln extrahierbarer Anteile. Die Absätze aus dem absoluten Alkohol werden mit den kleineren Mengen weißer Absätze aus dem Petroläther einfach vereinigt und im Exsikkator völlig nach vorhergehendem gründlichen Auspressen von Äthylalkohol befreit. Man muß sehr scharf alle Protagon- und Cerebrosidpräparate pressen, um die großen Mengen Mutterlauge, welche sie einschließen, zu entfernen, da sonst jedes Umkristallisieren illusorisch ist. Die ganz trockene Masse wird in siedendem absoluten Methylalkohol, und zwar in der gerade ausreichenden Menge gelöst, wobei sie fast ohne jeden Rückstand in Lösung geht. In diese siedende Flüssigkeit lassen wir so lange methylalkoholische Ätzbarytlösung, dargestellt aus reinstem, mehrfach umkristallisiertem Ätzbaryt in absolutem Methylalkohol, zufließen, so lange noch ein Niederschlag in der schwach siedenden Flüssigkeit entsteht und bis die Flüssigkeit, die über dem Niederschlag steht, deutlich Phenolphtalein rot färbt. Hierauf läßt man die Flüssigkeit auskühlen, filtriert den Methylalkohol ab, in welchem nur geringe Mengen organischer Substanz enthalten sind. Nach gutem Abpressen des Niederschlages auf der Nutsche verteilt man den Niederschlag in destilliertem Wasser und leitet, nachdem der Niederschlag sehr fein verrieben ist, unter öfterem Durchreiben Kohlensäure ein. Nach mehrstündigem Durchleiten der Kohlensäure wird die Masse auf der Nutsche möglichst scharf abgesaugt, mehrere Male mit destilliertem Wasser durchgewaschen, wobei noch kleine Mengen eines gelben Farbstoffes mitgehen, und hierauf mit 96%igem Alkohol und schließlich mit kleineren Mengen absoluten Äthylalkohols gewaschen. Nun wird die Masse mit siedendem absoluten Äthylalkohol ausgeholt, welcher nur äußerst geringe Mengen phosphorhaltiger Substanzen mitlöst. Die Hauptmasse aller phosphor- und schwefelhaltigen Verbindungen hingegen bleibt, wie wir uns überzeugt haben, in dem von *Kossel* und *Freytag* nicht weiter untersuchten Barytrückstand. Dieser besteht aus den Substanzen,

welche *Thudichum* anscheinend als Sphingomyelincadmiumchlorid dargestellt, und zwar in Form von Barytsalzen.

Phosphorsulfatidfraktion.

Wir arbeiten den Barytrückstand in folgender Weise auf:

Verfahren *a)*: Mit etwa 5%iger Salzsäure wird der unlösliche Rückstand angerieben und so lange mit der verdünnten Salzsäure kalt ausgewaschen, bis alles kohlensaure Baryum und das in den sauren Substanzen salzartig gebundene Baryum entfernt ist. Sobald das Filtrat mit Schwefelsäure keinen Niederschlag mehr gibt, wird die Masse mit Wasser so lange ausgewaschen, bis aus dem Filtrat die Chlorreaktion verschwindet. Dann wird die Masse mit wenig kaltem Alkohol gewaschen und hierauf aus absolutem Alkohol umkristallisiert. Man erhält so eine sehr stark saure Substanz, mit deren Untersuchung wir beschäftigt sind. Wird sie in siedendem Methylalkohol gelöst und wieder methylalkoholische Barytlösung zugesetzt, so fällt das Barytsalz der Substanz aus, welches glatt in Chloroform in der Kälte löslich ist, ebenso in Ligroin. Als wir diese Beobachtung gemacht hatten, haben wir unser Verfahren abändern können.

Verfahren *b)*: Die phosphorschwefelhaltige Hirnsäure, wie wir sie vorläufig nennen wollen, erhält man aus dem oben beschriebenen, Baryumkarbonat enthaltenden Barytniederschlag nach vorhergehendem Auskochen mit absolutem Äthylalkohol und so durchgeführtem Befreien von Cerebrosiden, in Form ihres Baryumsalzes, indem man den in absoluten Alkohol unlöslichen Rückstand mit Chloroform anreibt, und zwar mit sehr viel Chloroform oder noch besser mit Ligroin und von dem suspendierten und äußerst schwer durch Filtration entfernbaren Baryumkarbonat durch wiederholtes Zentrifugieren befreit, bis bei weiterem Zentrifugieren in den Gläsern kein Bodensatz mehr sichtbar und nur auf der Oberfläche eine kleine weiße Ausscheidung zu bemerken ist. Von dieser trennt man durch Abrahmen mittelst eines kleinen Löffels. Nach dem Einengen der Chloroform-, resp. Ligroinlösung des Baryumsalzes kann man dieses entweder aus Chloroform auskristallisieren lassen oder durch Alkohol fällen.

Aufarbeitung der Cerebroside.

Die Cerebroside trennen wir nun durch wiederholtes Umkristallisieren aus siedendem absoluten Methylalkohol mit einer zur völligen Lösung nicht ausreichenden Menge. Bei diesem Verfahren erhält man in absolutem Methylalkohol lösliches Cerebron, welches genau die empirische Zusammensetzung und die Spaltlinge, wie sie *Thierfelder* beschreibt, zeigt und eine in Methylalkohol unlösliche, aber aus absolutem Alkohol kristallisierbare Substanz, welche weitaus stickstoffreicher ist als Cerebron und welche als Spaltlinge ebenfalls Cerebronsäure und Sphin-

gosin, aber keine Galaktose liefert, sondern eine reduzierende Substanz, die sich mit Hydrazinen nicht verbindet, aber aus Wasser und aus Alkohol in makroskopischen Kristallen kristallisiert. Durch wiederholte Scheidung aus unzureichenden Mengen Methylalkohol und schließlich durch wiederholtes Umkristallisieren aus der fünfzehnfachen Menge eines Gemisches gleicher Teile von Methylalkohol und Methylacetat kann man das Cerebron von dieser Substanz befreien, diese aber wieder durch wiederholtes Auskochen mit Methylalkohol sowie Methylalkohol-Methylacetatgemisch und nachheriges Lösen des Rückstandes in absolutem Äthylalkohol gewinnen. Mit der Ausarbeitung dieser hier skizzierten, nunmehr sehr vereinfachten Methodik, welche meinen Mitarbeitern *Aladar Elfer* und *Kurt Linnert* zu verdanken ist, sind wir gegenwärtig beschäftigt.

Das so dargestellte Cerebron hatte den Schmelzpunkt des *Thierfelder*schen Cerebrons, erwies sich aber als aschehaltig. Wir haben diese beiden Cerebrosidpräparate durch Auswaschen mit kalter 1%iger wässeriger Salzsäure fast aschefrei machen können, sahen aber hierbei, daß die Schmelzpunkte der gewaschenen Präparate absanken.

Es bleibt noch ein Verfahren zu erwähnen, welches *O. Rosenheim* und *Christine Tebb* angegeben haben, welches es erlauben soll, bei der Extraktion aus dem Gehirn direkt die Cerebroside von den Phosphatiden zu trennen. Dieses Verfahren beruht darauf, daß Pyridin die Cerebroside schon in der Kälte, die gesättigten Phosphatide erst in der Wärme löst.

Wir haben dieses Verfahren nicht direkt mit Gehirn, aber mit der weißen Materie nachgeprüft und haben nicht das angegebene Resultat erreicht, ein Resultat, welches überdies nicht durch Analysen und Detailangaben belegt ist.

Otto Rosenheim schlägt nämlich vor, das phosphorhaltige Sphingomyelin und die phosphorfreien Galaktoside separat zu extrahieren, indem er Pyridin als Lösungsmittel verwendet. Er geht dabei so vor, daß er zuerst das Gehirn mit kaltem Aceton entwässert und von Cholesterin und Extraktivstoffen befreit. Hierauf erschöpft er das Gehirn mit Äther oder Petroläther, vermahlt den Rückstand auf einer Mühle und erwärmt das Pulver mit 3 Vol. Pyridin 10 Minuten lang bei 30—40° und läßt auf 15° vor der Filtration abkühlen. Man erhält ein klares rötliches Extrakt, welches Absorptionsbanden ähnlich jenem des Hämochromogens zeigt. Dieser Extrakt bekommt fortschreitend eine olivengrüne Farbe; man gießt ihn in 3—4 Vol. Aceton und erhält ein schweres Präzipitat von unreinen Galaktosiden, welches im rohen Zustande ungefähr ½% Phosphor enthält und durch fraktionierte Kristallisation in 2 Hauptteile geschieden werden kann: in das Phrenosin und Kerasin aus 85%igem Alkohol bei 36° und bei 0°. Die letzten Spuren Phosphor können mit essigsaurem Blei und Chlorcadmium (nach *Thudichum*) oder mit Zinkammonacetat (nach *Thierfelder*) oder durch Umkristallisieren aus Eisessig (nach *W. Koch*) entfernt werden. Das Sphingomyelin wird nun in der Weise dargestellt, daß man das Gehirnpulver mit 3 Vol. reinem Pyridin bei 40—45° eine ½ Stunde lang

erhitzt, das warme klare Filtrat kühlt man auf Eis bis zur Zimmertemperatur von 15°. Die Lösung wird grünlichopalisierend und es setzt sich ein durchsichtiger voluminöser Niederschlag, welcher als weißes, nichthygroskopisches Pulver nach der Filtration und nach dem Waschen mit Aceton erhalten wird. Dieses Rohprodukt enthält 3% Phosphor und kann dann nach den früheren Verfahren von *O. Rosenheim* und *Tebb* gereinigt werden.[1])

Die fraktionierte Extraktion der Gewebe mit Ausschluß von Gehirn.

Während beim Gehirn die fraktionierte Extraktion mit Aceton, leichtsiedendem Petroläther, abs. Alkohol oder wahlweise mit Ligroin sich uns als die zweckmäßigste sich erwiesen, konnten wir bei anderen Geweben die Erfahrung machen, daß nicht unter allen Umständen diese Reihenfolge eingehalten werden soll. Vielfach hat es sich als besser erwiesen, das Organpulver vorerst mit Petroläther zu extrahieren und dann erst mit Alkohol. Der petrolätherische Extrakt wird dann zuerst mit Aceton ausgefällt, der Niederschlag wieder in Petroläther gelöst und wiederholt mit Aceton gefällt. Besonders bei Untersuchungen der Leber, welche *Aladar Elfer* ausgeführt, hat sich dieses Verfahren bewährt.

Hingegen hat bei Untersuchungen des Blutes auch diese Modifikation im Stiche gelassen und *Julius Neumann* und *Edmund Hermann* haben das Verfahren, sowohl für Serum als auch für rote Blutkörperchen in der Weise angewendet, daß vorerst mit 95%igem Alkohol und dann mit Petroläther extrahiert wurde. Engt man die alkoholische Lösung bei hohem Vakuum ein, so kann man sowohl die Sterine als auch die Phosphatide, welche vorher in Petroläther nicht in Lösung gingen, nun mit Petroläther aus der eingeengten Flüssigkeit herauslösen und der weiteren Bearbeitung unterziehen.

Während im Gehirn kaum Fett zu finden ist, so daß dieses die Trennungsverfahren nicht alteriert, ergibt sich bei den anderen fetthaltigen Geweben die große Schwierigkeit, die Phosphatide und die Cholesteringruppe vom Fette zu befreien. Wir haben nach dieser Richtung hin die besten Erfolge bei der Auslaugung der Aceton- und Petrolätherfraktion mit kaltem 95%igem Alkohol gesehen.[1])

[1]) *Otto Rosenheim* und *Christine Tebb*, Journal of Physiology. **40**, Proc. of Physiol. Soc. Juli (1910).

[2]) *S. Fränkel* und *G. A. Pari*, Über die Phosphatide des Rinderpankreas. Biochem. Zeitschr. **17**, 68 (1909).

Die Methodik der Plankton-Untersuchung.

Von **Viktor Hensen,** Kiel.

Der Herr Herausgeber hat die Freundlichkeit gehabt, mich aufzufordern, über die Methodik der Gewinnung des Planktons zu berichten. Da die Sache erst neuerdings die Aufmerksamkeit weiterer Kreise auf sich gezogen hat, glaube ich zunächst die Absicht und die Bedeutung dieser Methodik durch eine Übersicht dessen, was gewonnen werden soll, klären zu dürfen.

Der Stoffwechsel im Meere hat für unsere theoretischen Anschauungen, soweit sie wenigstens das Entstehen und Vergehen der chemischen Verbindungen in den Organismen betreffen, erhebliche Bedeutung, da ja die Meeresflächen fast $^2/_3$ der Landflächen der Erde ausmachen. Das Studium des Stoffwechsels im Meere hat gegenüber dem des Stoffwechsels auf dem Lande seine Vorteile und seine Schwierigkeiten. Auf dem Lande liegen Berge, Täler, Flüsse und Seen, Wald, Wiese, Heide, Moor und Wüste in buntem Wechsel nebeneinander. Es sind dort überdies die Urzustände, von denen die Wissenschaft auszugehen hat, wenn sie sich mit dem Welträtsel beschäftigen will, in so ausgedehntem Maße durch den Menschen gestört, daß das Auffinden und die Auswertung des natürlichen Geschehens überall in hohem Grade erschwert ist. Von den kultivierten Landflächen sind wohl Mittelwerte durch den Ertrag an Rüben, Gras, Getreide, Weinbau und Holz gewonnen worden, aber wieviel organische Substanz die Wurzeln gebildet haben und wieviel davon durch Insekten, Schnecken, Würmer, Säugetiere und Vögel verzehrt worden ist, dafür fehlt so ziemlich jede Vorstellung sowie die Methodik, solche Vorstellung zu gewinnen. Wir wissen nur, daß diese Zehrungen zuweilen groß genug werden können, um die ganze Ernte zu vernichten, aber mittlere Werte fehlen ganz. Wenn auch durch Spezialkulturen die Masse der Wurzeln und bei Rüben der Blätter sich hat feststellen lassen, so fehlt doch für das Geschehen auf freiem Felde und nun gar für die Urzustände eine Abschätzung.

Im Meer treffen wir auf Urzustände. Die Wandlungen, die hier durch den Menschen bewirkt sind, müssen trotz aller Klagen über Überfischung als verschwindend klein erachtet werden. Eine gewisse Schwierigkeit liegt in der quantitativen Bestimmung der gut beweglichen Meeresorganismen

vor. Es läßt sich durch quantitative Bestimmung der Menge von Fischeiern und namentlich von Fischbrut, die in recht regelmäßiger Verteilung im Wasser umhertreibt, ein angenähertes Urteil über die Quantität der Fische mit der Zeit recht wohl gewinnen. Die Möglichkeit glaube ich an einigen für diesen Zweck ausgeführten Expeditionen in die Nordsee[1]) und ferner durch die Ergebnisse quantitativer Befischung des Atlantischen Ozeans[2]) nachgewiesen zu haben. Sehr fleißige Arbeiten von *Apstein*[3]), die auf der Fahrt der Valdivia ausgeführt wurden, haben dann auch für den Indischen und Stillen Ozean fast genau die gleichen Zahlen an Fischeiern und kleinen Fischchen ergeben, so daß die Möglichkeit, selbst über diese, sonst der Bestimmung unzugänglichen Organismen ein Urteil zu gewinnen, zwar noch sehr fern liegt, aber für energische Anstrengungen in einiger Annäherung erreichbar erscheint. Es liegt etwas ferner und ist weniger wichtig, die Menge der Cetaceen, Robben und Seevögel zu schätzen, eine Menge, die nicht unbegrenzt ist. Hier liegt aber der Fall vor, daß der Mensch die Urzustände erheblich verändert hat. Die in den warmen Meeren lebenden Schlangen und Schildkröten haben für den Stoffwechsel des Meeres äußerst geringe Bedeutung.

Der Ausgangspunkt des Stoffwechsels liegt wie auf dem Lande so im Meere in der CO_2, dem anorganisch gebundenen N und den Mineralsalzen, die allerdings im Meer nur in Lösungen zur Verfügung stehen. Mit Hilfe des Lichtes entwickeln sich daraus die Pflanzen, aber hier zeigt sich ein gewaltiger Unterschied zwischen Land und Meer. In ersterem Fall entwickelt sich das Leben der Hauptsache nach über der Oberfläche, im Meer in der Oberfläche, wohin also das Licht immer nur in einer gewissen Abschwächung dringen kann. Dieser Unterschied ist von geringerer Bedeutung als der, daß die Landpflanzen feststehen, so daß die CO_2 an ihnen vorbei treibt, und daß sie Wurzeln haben, durch deren Ausbreitung sie sich Mineralien und gebundenen N anzueignen vermögen. Die Meerespflanzen treiben, abgesehen von einigen Uferpflanzen, niemals Wurzeln und bleiben deshalb, sobald sie immer treiben müssen, sehr klein und niedrig gebaut. Weshalb Wurzeln an treibenden Pflanzen entweder nicht möglich oder schädlich sind, ist leicht zu sagen. Die ganze Pflanze schwebt im Mutterboden, sie ist selbst in gewissem Sinn Wurzel; außerdem würde ein Wurzelgeflecht sie noch mehr innerhalb einer begrenzten Wasserschicht fesseln, als dies schon ohnehin der Fall ist. Es bedürfen aber die Meerespflanzen ebensowohl eines stetigen Wechsels ihrer Umgebung wie die Landpflanzen. Diesen Wechsel bewirken sie in vielen Fällen durch Entwicklung von Geißeln, vielleicht auch durch stoßweiße Bewegung ihres Exoplasmas, in anderen Fällen haben sie die Fähigkeit, durch

---

[1]) *Hensen* u. *Apstein*, Die Nordsee-Expedition 1895. Wiss. Meeresunters. Kiel. N. F. Bd. 5. 1897.

[2]) *V. Hensen*, Übersicht und Resultate der quantitativen Untersuchungen. Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humboldt-Stiftung. Bd. 5. S. 354. Kiel, Lipsius. 1911.

[3]) *Apstein*, Mitteilungen d. deutschen Seefischervereins. Bd. 17. S. 251. 1901. Berlin.

Entwicklung von Fett, vielleicht auch durch Entwicklung von Gasblasen aufzusteigen, um zu anderen Zeiten wieder zu sinken und so die Umgebung zu erneuern.

Wie auf dem Lande so durchläuft auch im Meer ein Anteil der Pflanzenproduktion einen Kreislauf. Er wandert von Tier zu Tier und verwandelt sich dabei zum größten Teil wieder in seine Urbestandteile CO_2 und niedere N-Verbindungen. Ein kleiner Rest sinkt in Form abgestorbener Tierleiber zu Boden und wird auf diesem Wege teilweise aufgelöst. In nicht sehr großen Tiefen finden sich Schalenreste angehäuft, in sehr großen Tiefen scheinen aber auch diese vollständig der Auflösung zu verfallen. Man sollte glauben, daß hier ein großer Unterschied gegenüber dem Lande liegen müßte, aber auch dort verschwinden die Tierleiber, die wegen der starken Zeugung der Tiere mindestens so zahlreich sein müssen, wie die Tierwelt ist, die wir im Frühlingsanfang um uns erblicken, so gut wie spurlos. Ein anderer Teil der Pflanzen findet nicht als Nahrung der Tiere Verwendung. Dieser Teil überwiegt auf dem Lande, mindestens im Urzustand, noch heute den als Nahrung verbrauchten Teil ganz enorm. Der Anteil, der von Früchten, Blättern, Wurzeln und Holz verzehrt wird, ist zwar nicht abgeschätzt, aber zweifellos minimal. Im Meer liegt die Sache anders. Es finden sich zwar in gewissen Zonen kalten Wassers Ablagerungen kieselschaliger Algen, aber sehr ausgedehnt sind diese Flächen doch nicht. Namentlich ergibt aber die direkte Bestimmung des lebenden Pflanzengehaltes des Ozeans, daß in den warmen Meeren stets und in den kalten salzigen Gewässern durch längere Perioden das Volumen der Pflanzen das Volumen der Tiere nicht bedeutend übertrifft. Wir sind zwar zurzeit über das Volumen der Bakterien und der kleinsten, nur noch durch Filter und Zentrifuge gewinnbaren Organismen des sogenannten Nanoplanktons ungenügend unterrichtet, aber auch das Volumen der kleinsten tierischen Wesen ist noch unbekannt. Jedenfalls ist die Pflanzenmasse im Meer dem tierischen Bestand gegenüber unvergleichlich viel geringer, als auf dem Lande. Ein Überschuß der Pflanzenproduktion findet dennoch statt: im Norden, jedenfalls zu Zeiten der Wucherung, die sowohl für Diatomeen, wie auch für Peridiniales festgestellt sind, im warmen Wasser kontinuierlich. Ob die abgestorbenen Pflanzen den Meeresboden ozeanischer Tiefe erreichen, ist bisher nicht sicher ermittelt. In dem Stillen Ozean finden sich große Gebiete, auf denen noch die Zähne vorweltlicher Haifische ohne jeden Überzug organischen Schlamms vielfach gefunden worden sind. Dagegen ist in anderen Gegenden ein Kohle haltender, oft sehr weicher Schlamm heraufgeholt worden. Es bleibt hier aber die Möglichkeit bestehen, daß die derberen Reste der Ufervegetationen hingeflossen und diese Schlammassen nicht auf die Planktonpflanzen zu beziehen sind. Es werden in diesen Schlammassen Bakterien gefunden, die dann wohl zu einer Auflösung der den Boden erreichenden pflanzlichen und tierischen Massen beitragen. Im ganzen prävaliert der Eindruck, daß nur in Küstennähe und wenigstens in Abhängigkeit von den Küsten Ab-

lagerungen organischer Substanzen stattfinden, daß aber auf der Hochsee die ganze Produktion zu anorganischen Verbindungen aufgelöst wird. Wir hätten demnach auf der Hochsee einen sehr vollständigen Kreislauf der organischen Produktion, während auf dem Lande in den Urzuständen dieser Kreislauf sehr unvollständig ist. Die Untersuchung des Verhaltens im Meer hat bisher nur sehr unvollkommen ausgeführt werden können, sie wird sehr wesentlich mit der Untersuchung der Erzeugung der organischen Substanz dort zusammenhängen. Ich betone die Untersuchung im Meer, das heißt in der Hochsee, weil die Untersuchung des Verhaltens in den süßen Gewässern durch den Einfluß der verschiedensten Materien von den Ufern aus sehr verwickelt wird. In meiner zitierten, jetzt erscheinenden Arbeit über die Ergebnisse der Planktonexpedition glaube ich den Nachweis führen zu können, daß wegen genügend großer Gleichmäßigkeit der Verteilung der Planktonorganismen wohl die Aussicht besteht, ein im großen gesichertes Resultat über die dortigen Vorgänge und Produktionen zu gewinnen. Die Methodik der Untersuchungen ist noch in der Entwicklung begriffen und zweifellos noch sehr verbesserungsfähig, aber die Grundlagen für ein erfolgreiches Verfahren sind doch gesichert.

Die Methodik.

Die Aufgabe, Plankton, das heißt alles wesentlich treibende Material, für chemische Untersuchungen zu gewinnen, ist leicht oder schwer, je nachdem, was dabei beabsichtigt wird. Das einfachste Verfahren ist dies, mit einer Art Schmetterlingnetz, das mit einem der Absicht entsprechenden, mehr oder weniger dichten Zeug bespannt ist, die Oberfläche horizontal zu durchfahren. Größere Formen werden dabei spärlicher, die kleinen Formen reichlicher und massenhafter gefangen, aber je nach der Tages- und Jahreszeit wird sich in den kalten Gewässern das Ergebnis sehr verschieden gestalten. Das Netz wird über einem breiten Behälter mit Wasser umgestülpt und mehrfach abgespült und diese Prozedur eine entsprechende Reihe von Malen wiederholt. Man erhält eine dichte Ansammlung der Organismen, mit der dann zweckentsprechend weiter zu verfahren ist. Da die Massen in verschiedenen Wassertiefen verschieden und verschieden zusammengesetzt sind, ist auch versucht worden, diesen Horizontalfang in verschiedenen Wassertiefen auszuführen. Sobald diese Tiefen erheblich sind, muß das Netz größer genommen und vom Boot aus gezogen werden. Dies Verfahren ist sehr unsicher, weil der Widerstand der Schnur, an dem das Netz befestigt ist, bei etwas größerer Tiefe sehr ins Gewicht fällt; die Schnur bildet eine, nach der Geschwindigkeit des Zuges wechselnde Bucht und es ist sehr schwer zu bestimmen, in welcher Tiefe eigentlich gefischt wird, auch fängt das Netz, während es aufgezogen wird, noch etwas in den dazwischen gelegenen Wasserschichten, wenn nicht eine Schlußvorrichtung angebracht ist.

Behufs der chemischen Untersuchung lassen sich die größeren Organismen aus dem Fang heraussuchen, es ist aber selbst für diese die Be-

stimmung des Wassergehalts mißlich, weil sie meistens behaart oder mit mancherlei Fortsätzen bedeckt, daher nur unvollkommen von dem anhängenden Wasser zu befreien sind, während sie etwa mit Alkohol abgespült Wasserverlust erleiden werden. Bei Formen aus Salzwasser wird auch der Aschegehalt der Organismen durch dies anhängende Wasser zu ungenau bestimmt werden. Ganz fehlerfrei wird die Bestimmung des Wassergehalts nicht zu machen sein, aber die Organismen werden je nach ihrem Ernährungszustand verschieden wasserhaltig sein, so daß der Fehler bei sorgfältiger Behandlung der untersuchten Form keine große Bedeutung haben dürfte. Die Trennung der kleineren Organismen läßt sich in dieser Weise nicht ausführen. Es bleibt nichts übrig, als für diesen Zweck das sog. monotone Plankton abzuwarten und zu benutzen. Es kommen Zeiten vor, wo in dem kalten Wasser eine Gruppe von Planktonten, z. B. die Kieselalgen (Chaetoceras) oder die Phytoflagellate Ceratium tripos, so sehr überwiegt, daß alle anderen Planktonten dagegen verschwinden. Letztere werden zwar durchaus nicht fehlen, im Gegenteil auch vermehrt sein, aber ihr Gewicht tritt gegen das Gewicht der ganzen Masse doch sehr zurück. Um solche monotonen Fänge zu gewinnen, eignet sich das Fischen mit horizontalem Zug am meisten, weil dabei die Bewohner tieferer Wasserschichten fortfallen. Bei völliger Windstille entsteht zuweilen im Sommer eine grüne Rahmschicht im Wasser, die jeweilig aus Algen einer Art besteht und die neben der bezüglichen Art fast nichts Fremdes enthält. In den sog. Schwärmen finden sich gleichfalls Massen von Tieren einer Art. Diese Schicht eignet sich besonders für chemische Analysen. Es ist dabei aber zugleich die Zahl der Zellen bei Pflanzen oder der Tierarten bei der Analyse tierischer Planktonten auf die später anzugebende Weise festzustellen, wenn die Analysen allgemeiner nutzbar gemacht werden sollen. Auf diese Weise erfährt man nämlich den Gehalt von einer bestimmten Anzahl Zellen oder von den Tieren einer Art. Wenn dann später die Gesamtanalysen gemischter Fänge gemacht werden und diese Fänge gezählt sind, kann bestimmt werden, wie sich der Befund an Eiweiß, Fetten, Kohlehydraten und Salzen etwa auf die Formgruppen des Fangs verteilt. Auch die Volumina der einzelnen Organismengruppen zu bestimmen, kann auf Grund solcher Zählungen ausgeführt werden. *Lohmann*[1]) hat in dieser Richtung den Anfang gemacht. Er hat die Hauptformen nach ihren verschiedenen Dimensionen gemessen und auf Grund dieser Messungen unter Beachtung der Einzelheiten der Formen Modelle angefertigt, deren Volumen dann bestimmt wurde. Soweit diese Modelle richtige Mittelformen sind, kann lediglich auf Grund der Zählungen der Volumsanteil, den sie an dem Fang haben, berechnet werden. Die Aufgaben, die für etwas exaktere Analysen gelöst werden müssen, sind also recht groß, aber es läßt sich doch erkennen, daß sie gelöst werden können und daß der Besitz einiger

[1]) *Lohmann*, Untersuchungen zur Feststellung des vollständigen Gehalts des Meeres an Plankton. Wissensch. Meeresuntersuchungen. Kiel. N. F. Bd. **10**. S. 131. 1910

Reinanalysen es ermöglichen kann, auch dem Aufbau solcher Organismen, die gesondert zu gewinnen nicht möglich ist, näher zu kommen.

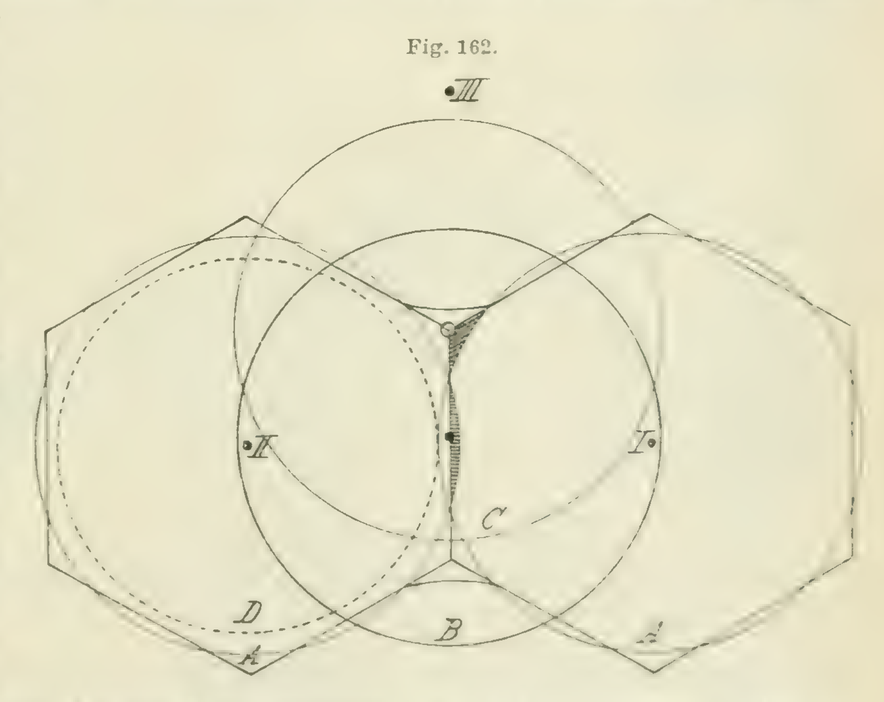
Wenn dem Stoffwechsel näher getreten werden soll, muß die gesamte Masse des Planktons bestimmt werden, die im Meer oder doch wenigstens in begrenzten Regionen eines Meeresteils vorhanden ist. Dies kann nicht durch Horizontalzüge, sondern nur durch Vertikalzüge erreicht werden. Diese Züge werden dadurch ausgeführt, daß ein Netz auf den Boden hinabgelassen und dann von da aus senkrecht aufgezogen wird. Ein und dasselbe Netz wird dann vergleichbare Fänge geben, die alles enthalten, was die Wassersäule, deren Querschnitt durch das Netz filtriert wird, an fangbarem Material enthält. Die Forderung ist freilich leichter zu stellen als zu erfüllen. Wenn das Meer die Tiefe von 4000 bis 5000 *m* hat, so ist die Zeit, die erforderlich ist, um ein Netz so tief hinabzulassen und wieder aufzuziehen, sehr groß. Der Aufzug kann nicht rascher als 1 *m* die Sekunde sein und nur ein sehr günstig für den Zweck konstruiertes Netz wird rascher als 1 *m* die Sekunde sinken. Außerdem muß die Tiefe ausgelotet sein, weil man nicht wird fühlen können, wann das Netz den Boden berührt, dazu ist das Gewicht des hängenden Seils viel zu groß. Nur wenn mit einer Lotmaschine gefischt werden kann, wird die Bodenberührung erkannt werden können. In der erforderlichen Zeit von 133·3 Minuten oder 2·2 Stunden treibt das Schiff, das ja nicht verankert werden kann, eine sehr erhebliche Strecke, kann aber doch mit Hilfe des Propellers ziemlich am Platz gehalten werden. Jedoch der Zeitverlust ist ein so lästiger, daß viele solche Fänge schwer ausgeführt werden können. Es ergibt sich aber, daß ganz überwiegend die Masse von Plankton nur bis höchstens 400 *m* Tiefe geht, so daß nur für besondere Zwecke das Netz tiefer zu gehen braucht. An flacheren Stellen kann man noch fühlen, wenn das Netz den Boden erreicht hat, hier ist also die genannte Aufgabe leichter zu erfüllen und muß erfüllt werden.

Bei solchen Fängen handelt es sich immer um Stichproben: es ist also zunächst die Frage zu erörtern, welchen Wert solche Stichproben für die Bestimmung des Planktongehalts haben. Es ist wesentlich Sache der Praxis, hier die Entscheidung zu bringen, doch hat auch die Theorie mitzusprechen. Die Praxis bestätigt in einer größeren Reihe von Fällen die Brauchbarkeit der Stichproben, die freilich im Verhältnis zur Meeresfläche immer nur äußerst klein sind. Die Zählungen der Fänge der Planktonexpedition führen den Nachweis, daß von einer Anzahl seltener Tierarten in 4 bis 6 sich folgenden Fängen gerade nur 1 Tier der Art auf der Strecke von 1000 und mehr Kilometern gefangen wurde, also die Verbreitung so gleichmäßig gefunden wurde, wie sie nach der Größe der Netzöffnung gefunden werden konnte. Wenn der Fang 100 oder 1000 und mehr Individuen aufbrachte, schwankten die Zahlen natürlich stärker, aber auch hier wurden gewisse Arten so gleichmäßig gefangen, daß die Nachbarfänge um weniger als 5% verschieden waren. Wenn aber solche Fänge noch als wesentlich gleich angesehen werden, die

noch nicht um das Doppelte voneinander abweichen, so war für manche gut fangbare Formen diese Gleichheit in dem Gebiet des warmen Wassers erheblich häufiger vorhanden als eine darüber hinausgehende Ungleichheit. Es gab aber doch gewisse Tierarten, die entschieden viel ungleicher verteilt waren, die also Neigung hatten, sich zusammenzuscharen. Für solche Fälle kann nur eine Vermehrung der Stichproben zu einigermaßen genügenden Resultaten führen.

Der analysierende Chemiker arbeitet immer mit Stichproben und er ist dazu berechtigt, weil die Zahl der Moleküle selbst in der kleinsten Stichprobe eine überwältigend große ist. Da es sich bei Stichproben des Planktons um relativ wenige suspendierte Teilchen handelt, legt sich die Frage, wie genau solche Stichproben den wirklich vorhandenen Zustand darstellen und darstellen können, sehr nahe. Dabei ist von der Annahme auszugehen, daß die Teilchen im Wasser vollkommen gleichmäßig verteilt sind und dabei möglichst dicht liegen. Diese Forderung wird erfüllt, wenn jedes Teilchen, d. h. für diesen Fall jede Planktontenart in der Mitte einer sechseckigen Säule, deren Höhe gleich dem kleinen Durchmesser des Sechseckquerschnittes ist, liegt. Da aber die Dichte sich nach der Tiefe zu verändert, genügt es, wenn angenommen wird, daß jede Planktontenart so in der Mitte der Säule liegt, daß sie, an die Oberfläche projiziert, die Mitte seines Sechsecks einnimmt. Je mehr Planktonten vorhanden sind, desto kleiner wird die Sechseckfläche werden, in der er liegt.

Fig. 162.



Sei nun zunächst entsprechend der Fig. 162 das Sechseck für einen Planktonten genau von so großem Querschnitte, wie die Fläche des fischenden Netzeingangs, der in der Figur als ein runder, kontinuierlich gezeichneter Kreis hervortritt, dann können drei Fälle eintreten. Wenn der Mittelpunkt des Netzeinganges irgendwo durch die weiße Fläche hindurchgeht, wird immer nur der eine Planktont I gefangen werden können. Geht aber die Mitte des Netzeinganges durch die gestrichelte Fläche, so werden die zwei Planktonten I und II gefangen werden. Geht aber die Mitte durch die gekreuzt schraffierte Fläche, so wird kein Planktont erbeutet werden. Die Wahrscheinlichkeiten dieser Fälle verhalten sich wie die entsprechenden

Flächen des Sechseckes, d. h. wie 92·5 zu 3·75. Wird der Netzeingang so klein, wie es der gestrichelte Kreis andeutet, so hört die Möglichkeit, daß zwei Planktonten gefangen werden, auf, dagegen steigt die Gefahr, daß kein Planktont gefangen wird. Wenn sich die Zahl der Planktonten, die innerhalb der Fläche des fischenden Netzeinganges liegen, vermehrt, so wird immer noch die Zahl der Planktonten eine wechselnde sein, je nach der Lage, die das Zentrum des fischenden Netzeinganges gehabt hat. Die mathematischen Formeln zur Berechnung der möglichen Unterschiede sind schwerfällig, ich habe aber, um einen Begriff über die bezüglichen Chancen der Fänge zu geben, eine kleine Tabelle graphisch festgestellt, die hier folgt:

Aufstellung Nr. 2. **Wahrscheinlichkeit des Fanges.**

Wenn sich unter der Fläche des Netzeinganges finden	1 Planktont	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Planktonten gefangen
wird in 100 Zügen die in der letzten Kolonne verzeichnete Anzahl Planktonten gefangen	3·75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
	92·5	29·11	2·61	—	—	—	—	—	—	—	1
	3·75	**46·42**	7·95	—	—	—	—	—	—	—	2
	—	24·47	**79·61**	21·04	—	—	—	—	—	—	3
	—	—	9·83	**72·06**	39·13	2·97	—	—	—	—	4
	—	—	—	6·10	**41·44**	32·20	—	—	—	—	5
	—	—	—	0·34	9·16	**35·65**	23·53	2·61	—	—	6
	—	—	—	0·46	10·27	29·08	**64·50**	29·18	12·57	3·32	7
	—	—	—	—	—	—	11·97	**44·56**	19·34	4·70	8
	—	—	—	—	—	—	—	23·65	**49·77**	37·01	9
	—	—	—	—	—	—	—	—	17·53	**39·13**	10
	—	—	—	—	—	—	—	—	0·79	6·56	11
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9·08	12
	100	100	100	100	100	99·9	100	100	100	99·80	

Diese Tabelle weist nach, daß sich mit der steigenden Zahl der Planktonten unter dem Netzeingang die Zahl fehlerhafter Fangmöglichkeiten vermehrt und daß die Chancen völlig richtiger Fänge entsprechend vermindert werden. Dagegen werden die Prozente der möglichen Anzahl von Planktonten, die fälschlich gefangen werden könnten, mit den steigenden Zahlen immer kleiner. Liegen in der Netzeingangsfläche 10 Planktonten vor, so kann der Fehler noch 20% betragen, liegen dort 100 Planktonten, so beträgt er nur 3·4%, bei 28.000 betragt er 1·2%, und bei 100.000 nur noch 0·3%.

Diese Rechnung setzt aber eine **vollkommen gleichmäßige Verteilung** der Planktonten voraus, die nicht zutreffen kann, weil die meisten Formen sich willkürlich bewegen können, und außerdem durch die Bewegung des Wassers durcheinandergewirbelt werden müssen. Ginge die Bewegung auch nur soweit, daß jeder Planktont bis an die Grenze seiner Sechseckfläche kommen könnte, so würden, wie ein Blick auf die Figur zeigt, statt 0 1 und 2 bis zu 7 Planktonten gefangen werden können, und nichts spricht dafür, daß diese Grenze eingehalten werden muß. Ein Überschreiten dieser Grenze wäre übrigens weniger störend, wenn **viele** Planktonten im

Bereich des Netzeinganges liegen, also wenn die Fläche der Sechsecke klein ist. Dies theoretische Verhalten ist daher sehr störend, namentlich freilich für diejenigen, die den Nachweis führen wollen, daß die Verteilung der Planktonten ungleichmäßig sei. Die Praxis lautet etwas anders. Es hat sich zwar unter unseren etwa 100.000 Zahlen kein Fall gefunden, in dem 90% der Fänge nur 1 und 10% keinen oder 2 Planktonten gebracht hätten, aber das liegt zum Teile daran, daß in keinem Stromgebiet des Ozeans so viele Fänge gemacht worden sind, daß diese Rechnung hätte sich genügend prüfen lassen. Es findet sich aber doch auf der siebenten der jetzt veröffentlichten Zähltabellen von der Alziope, einem Wurm mit ganz gewaltigen Augen, der daher auf die Jagd angewiesen ist, die folgende Fangreihe:

0.4.1.1.1.1.1.2.2.1.5.1.6.8.1.6.0.1.1.1.1.7.2.4.(13.20).

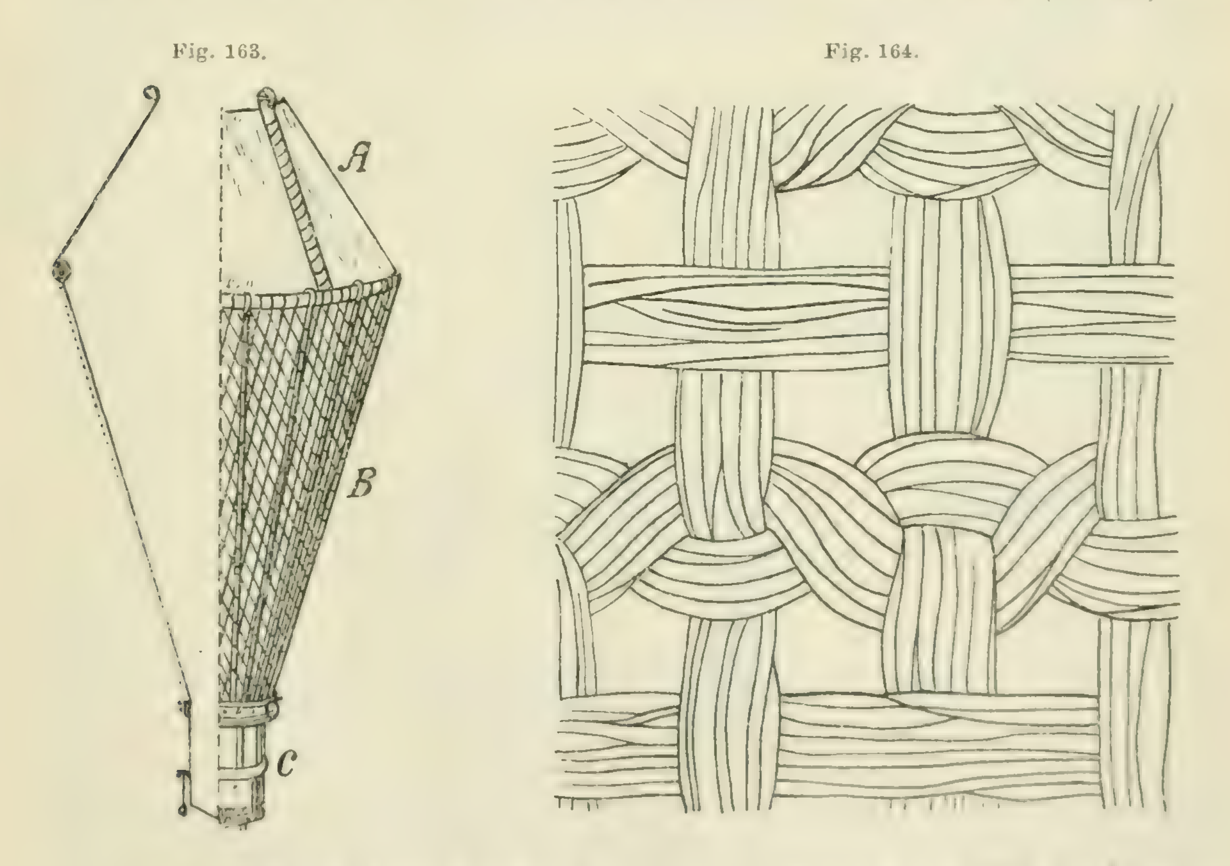


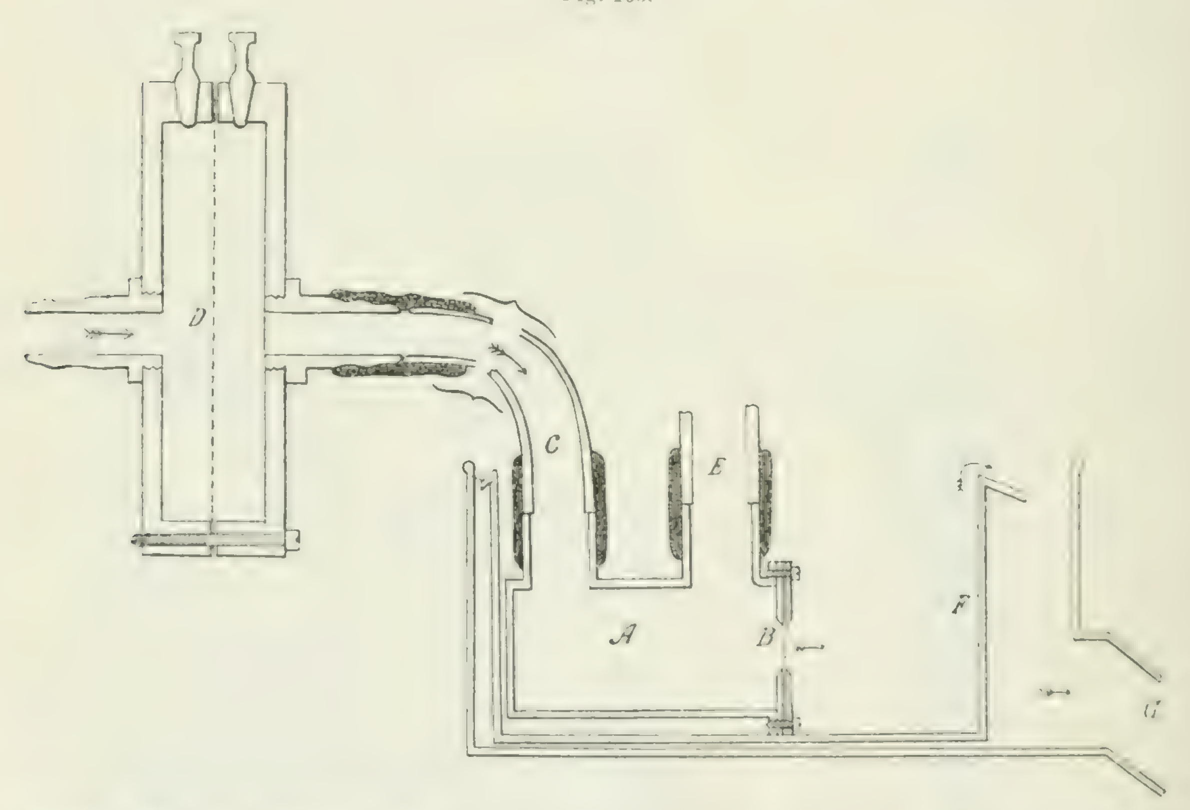
Fig. 163. Fig. 164.

Das sind 24 Fänge, die sich auf einer Strecke von 4090 *km* folgten. Die fangende Fläche des Netzeinganges hat 735 *cm*² betragen. Wie man sieht, fällt nur der eine Fang von 8 Stück aus der nach obiger Betrachtung zu erwartenden Reihe. Die Stromgebiete waren Sargassosee, Kanarienstrom, Nord-Äquatorialstrom und Guineastrom, also sehr verschiedene Strömungen. Dennoch könnte nach den Zahlen allein nicht behauptet werden, daß ein sicherer Unterschied in der Dichte der Tiere vorliege. Nur wenn man die Zahlenfolge zergliedert, wird ein gewisser Unterschied der Verteilung wahrscheinlich. Ich habe die Fangreihe wesentlich wegen der großen Beweglichkeit der Tiere ausgewählt. Es wird ersichtlich, daß für nicht zu hoch gespannte Anforderungen die Stichproben genügen können.

namentlich wenn größere Netzeingänge gewählt werden und wenn die Fänge aus einem Stromgebiete vereint und deren Mittelwert genommen wird.

Die Netzform, mit der die Hauptplanktonmasse gefischt wird, zeigt die Fig. 163. Daran sind zu unterscheiden 1. ein dichter konischer, den Eingang erheblich verengender Aufsatz *A*. 2. das eigentliche Netz *B* aus Müllergaze Nr. 25 (früher Nr. 20 bezeichnet) mit einem Schutznetz aus einem weitmaschigen gewöhnlichen Fischnetz bestehend. Dies Übernetz hat die Aufgabe, das eigentliche Netz bei zu großem Innendruck zu stützen und vor Zerreißung auf diese Weise zu schützen. Außerdem kann der Apparat daran angefaßt werden, während das Netzzeug selbst leicht zerreißt, wenn rauhe Hände es anfassen; 3. der Filtriereimer *C*, in den die ge-


Fig. 165.



fangene Masse schließlich hineingespült wird und der sich von einem unteren Ring, an dem das Netz befestigt ist, abtrennen läßt.

Das eigentliche Netz besteht aus eigentümlich gewebten, sehr feinen seidenen Fäden (Fig. 164). Die Poren haben eine Seitenlänge von im Mittel 0·049 *mm*. Die Fig. 163 zeigt ein Stück dieses Gewebes vergrößert. Es war nötig, die Filtrationsgröße dieses Gewebes zu bestimmen. Dazu hat der in Fig. 165 im Durchschnitt gezeichnete Apparat gedient.

Ein geschlossenes Rohr, *A*, ist an seinem einen Ende mit der zu untersuchenden Müllergaze *B* geschlossen. Durch das Rohr *C* wird in *D* filtriertes Wasser mit einer durch feine Hahnstellung regulierbaren Geschwindigkeit eingeleitet. In dem zweiten Rohr *E* steht ein Manometerrohr. Der ganze Apparat liegt in dem Blechkasten *F*, der mit Wasser gefüllt ist. Aus der Tülle *G* eines umhüllenden Kastens läuft das aus dem Rohr

A hinaus filtrierende Wasser. Das ablaufende Wasser wird in einem Meßgefäß eine bestimmte Anzahl von Sekunden aufgefangen und gemessen. Auf diese Art wird also bestimmt, wieviel Wasser sich unter bestimmtem Druck durch den cm^2 der Gaze entleert. Die verschiedenen Beobachtungen werden graphisch verzeichnet und zu einer Kurve verarbeitet. Von dieser Kurve sind die gleich zu verzeichnenden Zahlenreihen gewonnen. Man könnte glauben, daß diese Zahlenreihen besser durch eine geeignete Formel zu gewinnen wären. Das ist aber nicht zutreffend, denn es zeigt sich, daß das Wasser nicht lediglich durch die Poren fließt, sondern daß es mit einer mit dem Druck wachsenden Quote durch die Seidenfäden selbst hindurch filtriert, so daß die Filtrationsgröße nur empirisch bestimmt werden kann. Eine solche Bestimmung entnehme ich den Tabellen in meiner Methodik[1]), sie lautet für Seidengaze Nr. 25 (früher Nr. 20):

Druck *cm*	Filtrat cm^3/Sek.	△	Druck *cm*	Filtrat cm^3/Sec.	△
0·1	0·2393	0·2234	1·1	2·1676	0·1698
0·2	0·4627	0·2133	1·2	2·3374	0·1673
0·3	0·6760	0·2048	1·3	2·5047	0·1650
0·4	0·8808	0·1980	1·4	2·6697	0·1630
0·5	1·0788	0·1924	1·5	2·8327	0·1612
0·6	1·2712	0·1870	1·6	2·9939	0·1591
0·7	1·4582	0·1824	1·7	3·1530	0·1578
0·8	1·6406	0·1789	1·8	3·3108	0·1562
0·9	1·8195	0·1755	1·9	3·4670	0·1548
1·0	1·9950	0·1726	2·0	3·6218	—

Wenn g die Beschleunigung der Schwere, d den Druck bedeutet, so bestimmt sich die dem Druck äquivalente Geschwindigkeit v nach der Formel $2 g . d = v^2$.

Nicht jedes Stück der Gaze gibt genau dieselbe Filtrationsgröße, auch hat das Zeug die Eigenschaft, bei längerem Gebrauch zu schrumpfen und dann namentlich bei schwachem Druck schlechter zu filtrieren.

Der konische Aufsatz aus dichtem Zeug dient vielen Zwecken. Er hindert die Aufnahme von Schlick, falls das Netz den Boden berührt und er beugt den Verlusten durch die Orbitalbewegung der Wellen vor. Auf der See steigt das Wasser unter der Wellenoberfläche schnell genug, um je nach Größe der Welle Geschwindigkeiten von 0·5 bis 1 *m* und darüber zu erreichen. Dazu kann sich das Schlingern und Stampfen des Schiffes addieren. Das Netz, das mit 0·5 *m* Geschwindigkeit aufgezogen zu werden pflegt, wird in solchem Fall relativ sinken und sein Fang, der besonders an der großen oberen Peripherie abgesetzt ist, wird ausgespült und geht verloren. Wenn aber ein dichter unbeweglicher Aufsatz wie in Fig. 163 vorhanden ist, so wird der Fang in diesen Raum hineingespült und wird in

[1]) *Hensen*, Methodik. Ergebnisse der Plankton-Expedition. Bd. I. B. S. 86 Kiel 1895.

den nächsten Sekunden voll wieder in das Netz zurückkehren. Ferner wird durch den dichten Aufsatz auch noch die Eingangsöffnung stark verengt.

Dadurch wird verhindert, daß die absteigende Orbitalbewegung der Welle den Druck im Netz sehr in die Höhe treiben kann, weil das Wasser ja nur durch die verengte Eingangsöffnung in den Netzraum hineinströmen kann. Wäre die Mündung nicht verengt, so würde außerdem auch zu viel Oberflächenwasser filtriert werden und es würde, weil gerade die Oberfläche von gewissen Planktonten besonders dicht bewohnt wird, der Fang fehlerhaft und meistens zu groß werden. Der Gegendruck im Netz, der während des Aufzugs einen Teil des vor der Mündung stehenden Wassers beiseite schiebt, hört plötzlich auf zu wirken, sobald das Netz über die Wasseroberfläche gehoben wird und jetzt muß alles Wasser, das sich in dem Apparat befindet, filtrieren. Wäre die Eingangsöffnung so weit wie die Netzöffnung, so würde sehr viel Oberflächenwasser aufgenommen und filtriert werden; da die Eingangsöffnung aber stark verengt ist, wird die Masse des Oberflächenwassers nur unbedeutend vermehrt. Sehr wesentlich ist es, daß der Druck an der Netzwand durch die Verengung des Eingangs sehr herabgesetzt wird, so daß die zarten Planktonten möglichst wenig leiden.

Je kleiner die Wassermasse ist, die in der Zeiteinheit infolge der Hebung des Apparats durch den Eingang in das Netz hineinströmt, desto geringer muß der Filtrationsdruck sein, der diese Wassermasse durch die Netzwand treibt, desto langsamer wird das Wasser durch die Poren hindurchfließen. Zu dem Innendruck addiert sich freilich noch ein Zug an der Außenwand des Netzkonus, der von dem Winkel des Netzkonus abhängt und der von dem Innendruck fast unberührt bleibt.

Für das in Fig. 163 gezeichnete Netz berechnet sich, daß bei der gewöhnlichen Zuggeschwindigkeit von 50 *cm* die Sekunde der untere Rand einer Pore schon nach 0·000097 Sekunden die Lage des oberen Randes erreicht.

Der Strom durch die Pore beträgt höchstens 40·4 *cm* die Sekunde. Daher wird ein Planktont in der genannten Zeit nur die Strecke von 0·0039 *cm* durchlaufen können. Ist sein Radius oder seine Länge größer als diese 39 μ, so kann er nicht nach außen gelangen, sondern wird durch den unteren Rand der Pore wieder in das Netz zurückgeworfen und legt sich der festen, äußerst langsam filtrierenden Netzwand an. Diese hat, wie die Fig. 164 zeigt, eine relativ bedeutende Ausdehnung. Die Eigenbewegung der Planktonten, die hierbei in Betracht kommen, ist 2 bis 3 *mm* in der Sekunde, also so langsam, daß sie nicht mitzählt. Die zurückgeworfenen Planktonten legen sich neben größeren Formen namentlich auf dem oberen Rand des Netzes, wo der Innendruck am stärksten ist, fest und tragen zu einer weiteren Verengung der Poren bei, so daß hier neben Wasser nur die Bakterien und die allerkleinsten Formen noch durchschlüpfen können.

Daher werden noch viel kleinere Planktonten gefangen, als es der Porenweite des Netzes entspricht.

Wenn das Netz aus dem Wasser gehoben wird, tritt der große Übelstand ein, daß der bis dahin etwa 8 *mm* betragende Innendruck auf das 200fache und höher ansteigt und unter diesem Druck der etwa 500 *l* betragende Wasserinhalt durch die Poren entleert wird. Dabei gehen dann alle sehr kleinen Planktonten, soweit sie sich nicht zwischen den Haaren und Borsten der größeren Planktonten festgelegt haben, verloren.

Dieser Übelstand ist unvermeidlich, läßt sich aber verringern, wenn ein anderer Netztypus, den ich vorgeschlagen habe, der aber noch nicht genügend geprüft worden ist, verwendet wird. Ein rechteckiges Netz mit unten und oben gleichem Rahmen von 165 und 6·1 *cm* Seite, also einer Eingangsöffnung wie bisher von 0·1 *cm*² Fläche, wird mit einer 90 *cm* hohen Netzwand, deren Fläche 30 780 *cm*² sein würde, bespannt. Darunter findet sich ein Beutel aus dichterem Zeug, in den der Fang hinabgespült wird, um schließlich durch einen Hahn zu weiterer Verarbeitung entleert zu werden. Bei dem Herausheben dieses Netzes würden nur 50 *l* Wasser zu entleeren sein, außerdem würde die aufsteigende Orbitalbewegung der Wellen den Fang nicht entleeren können, weil die Netzwände senkrecht stehen. Die Vermeidung dieser Gefahr macht den dichten Aufsatz des jetzt im Gebrauch befindlichen Planktonnetzes entbehrlich und die neue Netzform kann sehr viel rascher sinken, setzt auch dem Aufzug nicht soviel Widerstand entgegen, als dies die jetzt üblichen Netzformen tun. Die Gefahren bei Berühren des Bodens bleiben freilich bestehen, auch könnten kräftige Schwimmer dieser Eingangsform leichter ausweichen, als bei dem in Fig. 163 gezeichneten Netz, endlich kann die a b s t e i g e n d e Orbitalbewegung schädlich sein.

Die Berechnung der Wirkung dieses Netzes ist folgende. In das aufsteigende Netz kann nicht mehr Wasser einströmen, als aus ihm hinausfiltriert, daher besteht die Hauptgleichung: Einstrom = Ausstrom.

Wird das Netz mit der Sekundengeschwindigkeit v_0 von 50 *cm* aufgezogen und sei die Eingangsöffnung 1000 *cm*², so könnten 50 000 *cm*³ in der Sekunde einströmen, aber weil eine Netzwand hinter der Öffnung ausgespannt ist, stellt sich diesem Einstrom ein Druck δ_0 im Netz, der die Filtration durch die Netzwand zu erzwingen hat, entgegen. Da die Netzwand 32 580 *cm*² beträgt, müßten in der Sekunde durch den Quadratzentimeter filtrieren 50.000 : 32.580 = 1·5346 *cm*³.

Nach der auf S. 647 gegebenen Tabelle erfordert diese Filtration einen Druck δ_0 von 0·742 *cm* Wasser. Der Druck, der der Bewegung von 0·5 Sek.*m* äquivalent ist, berechnet sich nach der Formel $v^2/2\,g = d$, wobei ich 2 g für Kiel zu 1962 *cm* rechne, v die Geschwindigkeit und d den Druck bedeutet. Der Druckwert d_0 wird danach 1·34 *cm*. Diesem Außendruck steht der obige Innendruck von $S_0 = 0{\cdot}742$ entgegen. Der zur Verfügung stehende Ü b e r d r u c k beträgt also $d_0 - \delta_0 = d$, also 1·34 — 0·742 = 0·598 *cm*. Nach der Formel $v = \sqrt{2\,g\,.\,d}$ erhalte ich durch den Druck von 0·598 *cm* eine Einstromgeschwindigkeit von $v_1 = 34{\cdot}25$ Sek./*cm*. Diese Geschwindigkeit ist zu gering, die Geschwindigkeit von 50 *cm* war zu groß. Die Summe der

beiden Geschwindigkeiten halbiert $\frac{v_0 + v_1}{2}$ also $\frac{50 + 34·25}{2}$ gibt den Wert für den Einstrom von $42·125 = v_2$.

Durch Division von v_2 mit 32·580 ergibt sich, daß dabei 1·293 *cm* durch jeden Quadratzentimeter des Netzes filtrieren müßten. Die Tabelle ergibt, daß um diese Filtration zu bewirken, ein Druck δ_2, von 0·612 *cm* erforderlich ist. Daraus ergibt sich der Überdruck am Netzeingang zu

$$d_1 - \delta_2 = \delta_3 \quad 1·34 - 0·612 = 0·728.$$

Mit der Geschwindigkeit des Einstroms, die dieser Überdruck hervorbringt, wird die Annäherungsrechnung fortgeführt. Auf diese Weise hat sich die nachfolgende Tabelle berechnen lassen.

Zuggeschwindigkeit pro Sek./*cm*	100	75	50	25
Äquivalenter Druck d = Sek./*cm* . . .	5·0975	2·8672	1·34	0·31858
Druck im Netz δ = Sek./*cm*	1·373	0·9404	0·559	0·202
Druck am Eingang d—δ = Sek./*cm* . .	3·7243	1·9268	0·781	0·11658
Ein- und Ausstrom pro Sek./*cm*³ . . .	85479	61534	38989	15170
Ein- und Ausstrom pro 1 *m*	85479	82025	77978	60680
Fläche des fangenden Eingangs . . .	855	820	780	607
Koeffizient pro Quadratmeter Fläche .	11·7	12·19	12·82	16·453

Die Tabelle zeigt den Unterschied der Filtrationsgröße, der durch Verschiedenheiten der Zuggeschwindigkeit verursacht wird, auch können die Wirkungen von Verschiedenheiten der Größe der Netzwand sowie die Unterschiede des Ertrages gleichgebauter Netze verschiedener Größe berechnet werden. Die absolute Größe der Planktonmasse, die auf die Einheit der Wasseroberfläche entfällt, läßt sich durch diese Rechnung nicht feststellen. Die Rechnung beruht auf der Annahme, daß auf der ganzen Netzwand ein gleicher Druck steht. Diese Annahme trifft nicht zu, sondern es findet sich ein Druckgefälle. Am Eingang ist der Druck größer als der Mitteldruck, und da hier bereits viel Wasser abfiltriert, sinkt der Druck nach der Endfläche des Netzes mehr und mehr ab. Der große Druck an dem Eingang mindert den Überdruck, daher wird weniger Wasser in das Netz hineinfließen, als die Rechnung nachweist. Wahrscheinlich findet außerdem wegen der Rauhigkeit der Netzwand an deren Außenfläche ein gewisser Zug statt. Es läßt sich daher die wahre Filtrationsgröße nur empirisch bestimmen. Zu diesem Zweck wird die Eingangsöffnung auf das 20- bis 40fache verengt und eine Reihe von Zügen mit dieser verengten Öffnung ausgeführt. Zugleich werden einige Züge mit der freien Eingangsöffnung an dem gleichen Ort zu gleicher Zeit ausgeführt. Dann wird die Zahl derjenigen Planktonten, die sicher fangbar und in größerer Anzahl in den Fängen vorhanden sind, bestimmt. Bei den mit kleiner Öffnung gemachten Zügen ist der Innendruck so klein, daß nur 1 oder 2% der Wassermasse, die wirklich hätte filtriert werden können,

verloren geht, wie die Rechnung feststellt. Man erfährt also, wie zahlreich die Anzahl der bezüglichen Planktonten unter dem Quadratmeter der Oberfläche ist. Die Züge mit dem freien Eingang ergeben einen beträchtlichen Verlust der bezüglichen Planktonten. Eine Division der gefundenen Zahl in die Zahl, die sich aus den Zügen mit verengter Mündung als Planktontengehalt unter dem Quadratmeter ergeben hat, gibt als Quotienten den Faktor, mit dem der Fang des Netzes mit $^1/_{10}\,m^2$ Eingang zu multiplizieren ist, um den Gehalt unter $1\,m^2$ der Oberfläche kennen zu lernen. Selbstverständlich muß die Tiefe des Vertikalzuges die gleiche sein. Da die fischende Fläche des Eingangs bei diesem Versuch ermittelt wird, ist damit auch festgestellt, wieviel Wasser in einem Netzzug bestimmter Länge filtriert worden ist. Für das bisher gebrauchte große Planktontennetz hat sich so der Netzfaktor zu 13·6 ergeben.

Exakter ist dem Anschein nach das Schlauchverfahren. Es kann freilich nur zum Fang von Formen, die recht zahlreich vorhanden sind, also namentlich zum Fang des Nanoplanktons dienen, weil damit etwa 300mal weniger gefangen wird als mit dem Planktonnetz, aber es bringt dagegen absolut alles auf, was in der durchfischten Wasserschicht vorhanden ist. *Lohmann* hatte für seine Untersuchungen in dem Mittelmeer und später in dem Kieler Hafen Wasser aus bestimmten Tiefenschichten gewonnen, indem er einen Gartenschlauch bis zu dieser Tiefe hinabgehen ließ und dann von dort Wasser aufpumpte und analysierte, indem er das Wasser teils durch gehärtete Filter oder selbst durch Seidentaffet filtrierte und für die feinsten Planktonten zentrifugierte. Eine genügend kräftige Zentrifuge würde noch gestatten, selbst die Bakterien zu sammeln und direkt zu zählen, nur ist dicht am Lande soviel an Schmutz und tierischen Exkrementen in dem Wasser vorhanden, daß dadurch die Zählung erschwert werden kann. Für die Ozeanforschung kommt es darauf an, zu bestimmen, was in der ganzen Wassersäule an organischem Material vorhanden ist. Ich habe in den Ergebnissen Bd. V, O., S. 20 vorgeschlagen, einen Gartenschlauch von 200 *m* Länge und 2 *cm* Lichtendurchmesser, der an dem Ende mit einem Gewicht beschwert ist und dessen anderes Ende am Deck liegt, senkrecht hinabgehen zu lassen. Dabei wird dann eine Wassersäule, die den Querschnitt der Lichtenweite des Schlauches hat, gleichsam ausgestochen. Dann wird die Schlauchmündung an Deck geschlossen und das untere Ende des Schlauches in die Höhe gezogen. Jetzt wird die Schlauchmündung an Deck geöffnet und aus dieser wird der Inhalt des Schlauches, der vom unteren Ende her an Deck geholt und dort aufgewunden wird, in bereitstehende Gefäße entleert. Hierbei wird das Wasser aus verschiedenen Tiefen für sich gewonnen und analysiert werden können. Es werden etwa 50 *l* Wasser bei diesem Verfahren verarbeitet werden müssen. Zum erstenmal auf der antarktischen Fahrt von *Filchner* wird das Verfahren verwendet werden. Da zunächst nicht einzusehen ist, was den Erfolg dieses Verfahrens hindern sollte, wird es schon hier erwähnt. Bei dem kleinen Querschnitt des Schlauches haften ihm die

Fehler der Stichproben in hohem Maße an, doch hat dies für das Nanoplankton, das sehr hohe Zahlenwerte zu geben pflegt, geringe Bedeutung. Größere Tiefen als 200 *m* dürften mit dem Schlauch kaum erreicht werden können.

Um den Inhalt größerer Tiefen zu bestimmen, kann ein doppeltes Verfahren dienen.

1. Dieser Inhalt kann in einfachster Weise durch Stufenfänge bestimmt werden. Es werden an demselben Ort Fänge aus geringer Tiefe und dann eine Reihe Fänge aus immer steigender Tiefe gemacht. Es läßt sich dann durch die Zählungen die Vermehrung des Gehalts an Planktonten in den Tiefenzügen und durch das Auftreten sowie durch die besondere Vermehrung der tiefgehenden Formen ein Urteil über den Bestand der tieferen Wasserschichten gewinnen.

2. Es werden für diesen Zweck besondere Schließeinrichtungen verwendet. Diese Aufgabe wurde früher mit dem *Chun*schen Schließnetz zu lösen versucht. Dieses Netz ist so eingerichtet, daß es geschlossen in die Tiefe geht. Im Beginn des Aufzuges beginnt ein Propeller, der eine Schraubenmutter dreht, zu laufen. Dabei bewegt sich die Schraubenmutter an einer Schraubenstange aufwärts. Bei deren Aufwärtsbewegungen löst sich zunächst eine Vorrichtung, die bis dahin das Netz geschlossen hielt, so daß das Netz jetzt zu fangen beginnt. Nachdem dann die Schraubenmutter eine längere Strecke an der Schraube aufwärts gestiegen ist, löst sie die Haltedrähte, an denen bis dahin das Netz hing. Das Netz sinkt daher etwa 2 Fuß hinab und wird dann an anderen Drahtseilen so gehalten, daß die Netzbügel zuschlagen. Fortan bleibt durch eine Verschlußeinrichtung das Netz dauernd geschlossen. Hierbei ist der große Übelstand, daß sowohl dadurch, daß das Netz fällt, wie auch dadurch, daß es sich zusammenlegt, ein großer Teil des Inhaltes, namentlich soweit er an dem oberen Rand des Netzes lagert, ausgeschwemmt wird. Es eignet sich daher dies Netz nicht zur quantitativen Bestimmung des Inhaltes der tiefen Schichten.

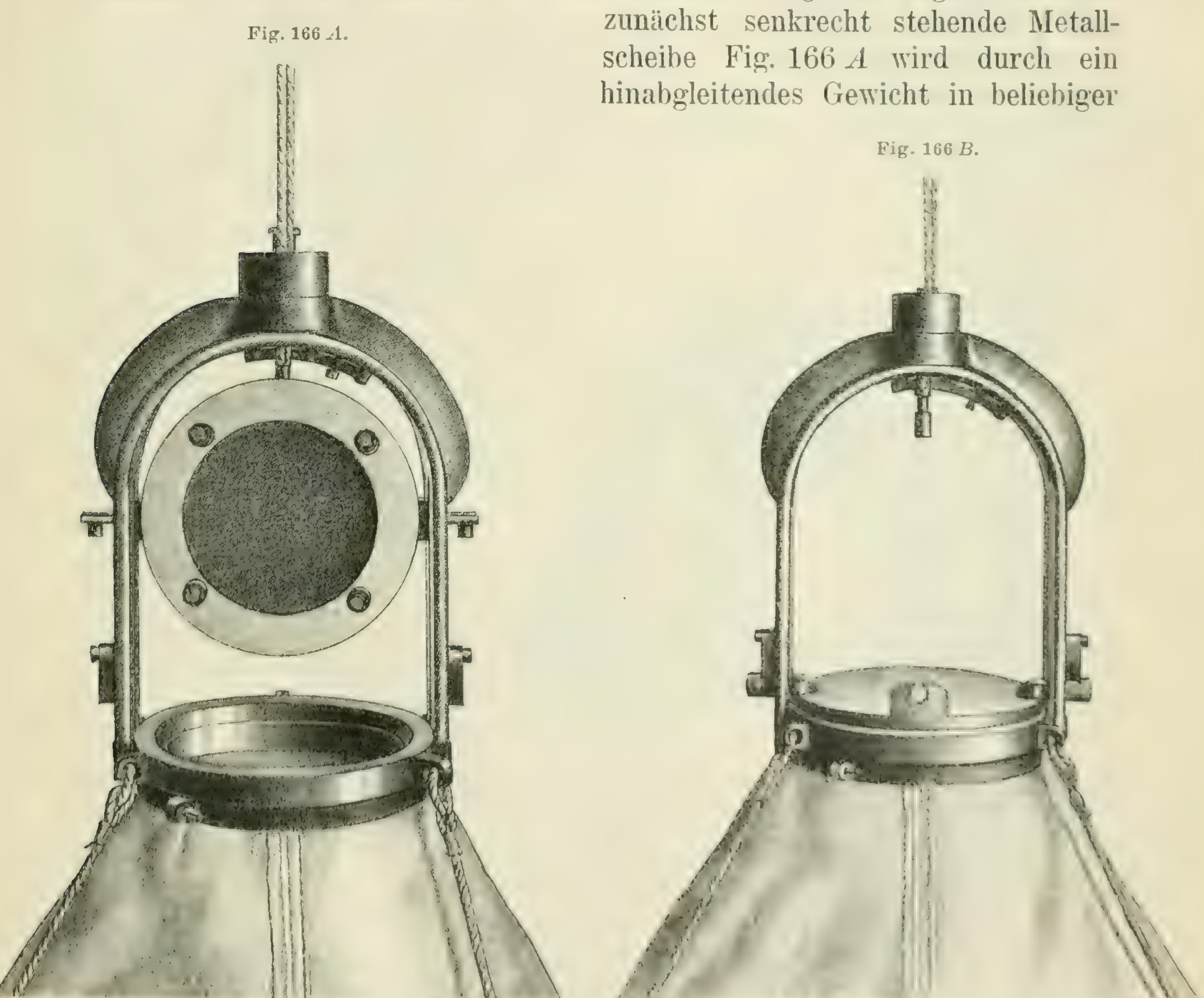
Ein zweiter, jetzt sehr vielfach gebrauchter Apparat wird als Nansennetz bezeichnet. Der obere Teil dieses besteht aus dichtem Zeug, es geht offen in die Tiefe, fällt daher etwas langsam. Es ist daran die zuerst in Helgoland gebrauchte Schließeinrichtung angebracht, die, für Horizontalzug bestimmt, für diesen Zweck recht brauchbar ist. Nachdem nämlich das Netz eine beliebige Strecke der Tiefe durchfischt hat, wird ein Gewicht an dem Drahtseil hinabgeschickt. Dies Gewicht löst dann die Haltetaue, an denen bisher das Netz hing, los. Das Netz sinkt und wird dann durch eine Schlinge, die um den unteren Teil des dichten Zeuges gelegt ist, gefangen, zugeschnürt und so verschlossen an Deck geholt. Es besteht also wieder der Übelstand, daß vor dem Schluß durch den Fall und das Zusammenschnüren des Netzes ein wesentlicher Teil des Fanges ausgespült werden muß.

Eine Verbesserung der Einrichtung ist dann durch den dänischen Forscher *Joh. Petersen* in Vorschlag gebracht, der durch ein hinabgesandtes

Gewicht zwei über dem Netzeingang angebrachte Klappen löste, die fortan den Netzeingang verschlossen. Ich habe diese Einrichtung in einigen Details modifiziert und es sind u. a. von *Apstein*[1]) mit dieser Einrichtung wertvolle Resultate über die Verteilung des Planktons in den verschiedenen Tiefenschichten auf den Untersuchungsfahrten des „Poseidon“ in der Nord- und Ostsee gewonnen worden. Eine recht gute Verbesserung dieser Einrichtung ist von dem hiesigen Mechaniker *Zwickert*, der die meisten Planktonapparate beschafft, erfunden. Sie wird in nebenstehender Fig. 166 abgebildet. Eine zunächst senkrecht stehende Metallscheibe Fig. 166 *A* wird durch ein hinabgleitendes Gewicht in beliebiger

Fig. 166 *A*.

Fig. 166 *B*.

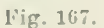


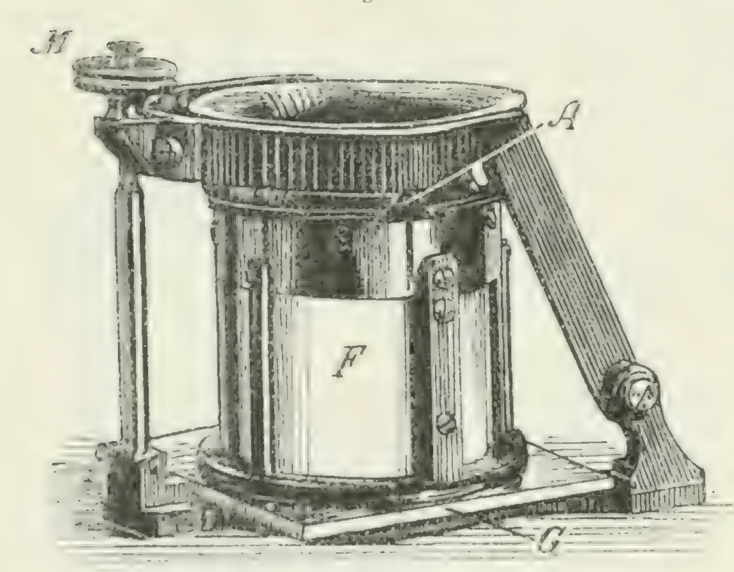
Tiefe aus der senkrechten Lage befreit und fällt dann, indem sie sich durch eine besondere Einrichtung der Führung horizontal umlegt, auf den Netzeingang, den sie dauernd schließt, Fig. 166 *B*. Bei diesen Schließnetzen kommen häufig Mißerfolge vor, weil nicht alles bei Seegang regelrecht funktioniert. Die gezeichnete Einrichtung scheint mir die obwaltenden Schwierigkeiten am besten zu lösen.

[1]) *Apstein*, Plankton der Nord- und Ostsee. Wissensch. Meeresuntersuchungen. Kiel. N. F. Bd. 9. 1906. S. 1.

Für die Untersuchung der Flüsse, der Süßwasserseen und der Tümpel sind viele Apparate angegeben worden, doch handelt es sich dabei meistens um Horizontalfänge und die Untersuchung des Wassers der Oberfläche oder bestimmter Tiefen. Meines Erachtens dürfte das Schlauchverfahren die meisten dieser Apparate ersetzen können und sich als das genaueste Verfahren erweisen, soweit es sich um quantitative Bestimmungen handelt. Auf diese Methoden wird daher hier nicht eingegangen, eine recht eingehende Beschreibung der üblichen Methoden ist von *Kolkwitz* veröffentlicht, auf die verwiesen sein mag.[1])

Im ganzen macht sich die Tendenz geltend, mit kleinen Stichproben, also entsprechend mit kleinen Netzen zu arbeiten. Dabei wird der Gedanke verfolgt, daß die Untersuchung kleiner Stichproben Arbeit erspare, daher leichter durchführbar sei. Ich kann dem nicht beistimmen. Große Stichproben, also Fänge mit größerem Netz stellen das Verhalten in dem Wasser besser fest als kleine Stichproben. Wenn man sich begnügen muß, nur einen geringen Anteil des Fangs genau zu analysieren, so gibt doch immer die gleich große analysierte Probeentnahme des großen Fangs ein besseres Bild als die des kleinen Fangs. Die Multiplikation der untersuchten Fangmasse mit der Zahl, die den Gehalt z. B. für 1 m^2 Oberfläche oder für eine größere Masse geben soll, wird ein weniger fehlerhaftes Resultat geben, wenn die Quote einem größeren, als wenn sie einem kleinen Fang entnommen wurde. Außerdem enthält der große Fang noch genügende Mengen seltener, schon mit bloßem Auge erkennbarer Formen, die in dem gleichen kleinen Fang zu selten sind oder ganz fehlen.


Fig. 167.



Der Fang des Netzes wird durch Bewerfen oder Bespritzen in den angehängten Filtriereimer gespült, hier konzentriert und dann aus dem Eimer sorgfältig entleert und in den Filtrator (Fig. 167) gebracht, um dort möglichst von Wasser befreit in die Konservierungsgefäße gebracht zu werden. Der Filtrator ist ein Becher mit unten durchbrochener Wand, in die die Müllergaze oder dichtes Zeug, selbst gehärtetes Filtrierpapier gespannt werden kann. Der untere Rand des Bechers ist sehr niedrig, aber möglichst breit, er wird mit der Gaze überzogen und auf eine untergelegte

[1]) *B. Kolkwitz*, Entnahme- und Beobachtungsinstrumente für biologische Wasseruntersuchungen. Mitteilungen aus der kgl. Prüfungsanstalt für Wasserversorgung und Abwässerbeseitigung in Berlin. 1907. Heft 9. S. 111.

Glasplatte *G* aufgepreßt, so daß hier Wasser nicht entweichen kann. Die Pressung wird durch den Rahmen bewirkt, der auf den Keil *A* mit Hilfe der Schraubenmutter *M* fest aufgedrückt wird. Weil sich die Masse der Planktonten gegen die filtrierende Wand festlegt, läuft das Wasser nur langsam ab und selbst sehr kleine Planktonten gehen nicht mehr durch die Gaze. Nachdem der Fang genügend konzentriert worden ist, hebt man den Filtrierbecher vom Glase, auf dem die größte Masse des Fangs liegt, ab und entleert den Fang in die Sammelgefäße und der noch an der Wand des Filtrators anhaftende Fang wird mit Leichtigkeit durch eine Spitzflasche abgespült und gesammelt.

Der Fang wird in Alkohol, Formol, Osmiumsäurelösung von 1⁰/₀ oder einer 2·5⁰/₀igen Lösung von doppeltchromsaurem Kali konserviert. Eine allseitig gut konservierende Lösung ist bisher meines Wissens nicht gefunden und wird sich auch kaum finden lassen, weil die Eigenschaften der verschiedenen Formen den Konservierungsflüssigkeiten gegenüber zu verschieden sind. Die konservierten Massen sollen nicht lange aufbewahrt werden, weil dabei Veränderungen und Auflösungen der Hüllen stattfinden können. Manche weichen Planktonten, namentlich die des Nanoplanktons werden durch die Konservierung ganz unkenntlich; sie müssen frisch oder doch nur mit etwas Osmiumsäuredampf behandelt, untersucht werden.

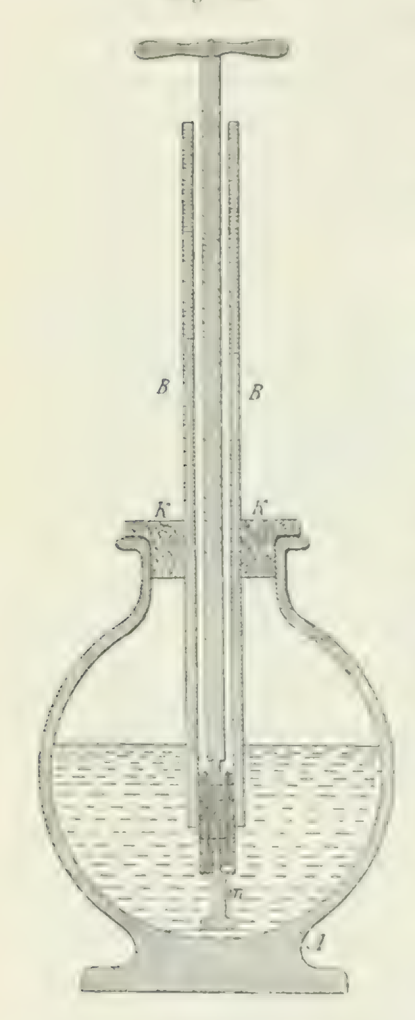
Nachdem sich die Masse 24 Stunden lang abgesetzt hat, wird ihr Volumen bestimmt. Wegen der oft sehr zahlreich in den Fängen enthaltenen sperrigen Massen kann aus diesen durch Absetzungen entstandenen Volumenmessungen nicht viel gefolgert werden, nur bekommt man einen Anhalt dafür, wie groß die Verdünnung werden muß, um für die Zählung vorzubereiten. Für die Volumenbestimmung sehr kleiner Fänge hat *Apstein*[1]) einen zweckmäßigen Apparat angegeben. Ich gehe aber auf das Verfahren zur Volumenbestimmung nicht weiter ein, weil sich bisher ergeben hat, daß doch immer nur die Zählung gute Resultate gegeben hat. Es hat aber, wie schon erwähnt, *Lohmann* begonnen, das mittlere Volumen der einzelnen Planktontenarten plastisch nachzubilden und auf diese Weise deren Volumen im einzelnen festzustellen, so daß mit Hilfe der Zählungen das wahre Volumen der Fänge würde festgestellt werden können, wenn die mittleren Volumina aller Planktonten bekannt sein werden.

Für die Zählungen wird der ganze Fang in Wasser auf ein angemessenes Volumen gebracht und von diesem Volumen werden mit Hilfe des Schüttelgefäßes (Fig. 168) Stichproben entnommen. Für diesen Zweck dient die Stempelpipette *B*, ein Glasrohr, in dem eine Reihe von Korkscheiben, die nach Bedarf durch kleine Schrauben zusammengepreßt werden können, an einer Führungsstange befestigt sind und an deren unterem Ende ein messingner Hohlzylinder befestigt ist. Während die Flüssigkeit stark durchschüttelt wird, stößt man das Glasrohr auf den Boden des

[1]) *Apstein*, Neue Apparate für Meeresforschung. Mitteilungen d. Deutsch. Seefischerei-Vereins. Berlin. 1909. Nr. 11.

Schüttelgefäßes und fängt dadurch die beabsichtigte Quote des Volumens aus der ganzen Masse heraus. Der Messingzylinder ist so ausgedreht, daß der Raum zwischen ihm und der Glaswand genau das verlangte Volumen enthält. Dies Volumen wird durch Wägungen festgestellt. Es sind Pipetten zu benutzen, die Volumina von 0·1, 0·2, 0·5, 5 und 10 cm^3 fassen. Diese Einrichtung ist erforderlich, um während des Schüttelns die Proben entnehmen zu können. Zugleich muß die Pipette eine weite Mündung haben, um die Fehler, die die Stichproben suspensierter Teile mit sich bringen, möglichst zu vermindern. Eine gewöhnliche Pipette mit enger Mündung kann für diese Entnahmen nicht dienen.

Fig. 168.



Die Pipette wird dann auf eine liniierte Glasplatte entleert und ihr Inhalt an Planktonten wird ausgezählt. Bei der Zählung von Blutkörperchen pflegt man nur eine Anzahl von Quadraten der entsprechend geteilten Zählkammer zu bestimmen und zieht nicht die Größe des Tropfens in Rechnung. Bei den Planktonzählungen muß der ganze Pipetteninhalt ausgezählt werden, was bessere Resultate gibt. Zuerst werden nur die Volumina von 0·1 cm^3 gezählt und sofern es sich dabei um Diatomeen handelt, läßt man das Präparat trocken werden, weil dann die kieselschaligen Formen am deutlichsten hervortreten. Da zu gewissen Zeiten über 100 Millionen einer Diatomeenart gefangen werden, müssen eigentlich 10.000 Stück durchgezählt werden, aber jedenfalls sollten über 1000 Stück durchzählt sein. Es empfiehlt sich in solchem Fall, jedes 100 durch eine hingelegte Marke zu registrieren, da man dabei die Augen nicht von dem Mikroskop zu entfernen braucht und die Stelle, wo 100 erreicht worden sind, nicht aus dem Auge verliert. Bei diesen Zählungen darf keine zu kleine Vergrößerung verwendet werden.

Man glaubt freilich die Formen deutlich genug bei kleiner Vergrößerung erkennen zu können; meine Versuche haben aber gezeigt, daß eine Nachzählung desselben Präparates mit stärkerer Vergrößerung ergibt, daß 20% und mehr bei der zu kleinen Vergrößerung übersehen sind. Da sich mit kleiner Vergrößerung bequemer zählen läßt, wird, glaube ich, in dieser Richtung oft gesündigt. Die Diatomeen mittlerer Größe sollten immer bei mindestens 200facher Vergrößerung gezählt werden. Nachdem

[1]) *Hensen*, Über die Bestimmung des Planktons. 5. Bericht d. Kommission z. wiss. Unters. d. deutschen Meere. 1887.

von den kleineren Formen genug gezählt worden sind, entnimmt man für die Zählung der größeren Formen größere Volumina und schwächere Vergrößerung und schreitet so fort, bis man ein Volumen von 10 cm^3 hat nehmen können. Auf die größten und daher leicht sichtbaren Formen wird schließlich der ganze Rest durchzählt. Für diese Zählungen braucht man meistens keine Bedeckung durch Deckgläser. Die Objekte legen sich auf dem Glase fest, selbst wenn das Präparat eingetrocknet ist, sind kaum Verschiebungen zu fürchten. Um die größeren Volumina zu zählen, bedarf es großer Glasplatten und überhaupt sind Einrichtungen erforderlich, um das Präparat mechanisch sicher den Kolonnen der Glasplatte entlang schieben zu können. Ich habe dafür ein großes Zählmikroskop anfertigen lassen, an dem mittelst zweier Schrauben die Verschiebungen bewirkt werden und an dem immer sichtbar wird, in welcher Richtung die Bewegung gegangen ist.[1] Dann schadet es nichts, wenn man bei der Zählung gestört wird. Meistens begnügt man sich mit gewöhnlichen Mikroskopen, an denen dann Einrichtungen für die mechanische Bewegung der Platte getroffen sind. Für Zählungen kleinerer Fänge genügt dies auch, aber es muß betont werden, daß die Resultate mit großen Fängen erheblich genauer werden. Für das Nanoplankton und die Zentrifugenfänge kommen nur sehr kleine Volumina zur Zählung, die aber starke Vergrößerungen erfordern, unter Deckglas geschehen müssen und entsprechend schwieriger, unbequemer, auch wohl noch weniger genau sind. Überhaupt müssen vorläufig die Anforderungen an Genauigkeit nicht hoch gespannt werden. Das ganze Untersuchungsfeld ist noch so wenig bebaut, die Unterschiede der Dichte sind nach den Jahreszeiten und nach den Gewässern noch so groß, daß feinere Unterschiede vorläufig bedeutungslos sind.

Die Mühen und Kosten, die mit der Gewinnung und Verarbeitung einer Fangreihe verbunden sind, werden so groß, daß dagegen die Kosten eines guten Untersuchungsapparates sehr zurückstehen. Da aber der Apparat meistens erst später in der erforderlichen Ausdehnung angeschafft wird, drückt darauf die Geldfrage und bewirkt eine Sparsamkeit, die nicht proportional dem Zwecke und den Kosten des ganzen Unternehmens ist. Das drückt dann nicht nur den Erfolg der bezüglichen Untersuchung hinunter, sondern schädigt auch noch den Kredit besserer Untersuchungen.

Die Zählungen, die restlos durchgeführt werden können, sind selbstverständlich möglichst genau. Die Fehlergrößen und deren Wahrscheinlichkeiten bei Zählungen, bei denen auf den ganzen Fang aus Teilzählungen geschlossen werden muß, sind von *Abbe* in meiner Methodik rechnungsmäßig genau nachgewiesen. Je größer die Summen sind, die gezählt wurden, und je häufiger die Probeentnahmen waren, von denen schließlich das Mittel zu nehmen ist, desto geringer sind wahrscheinlich die Fehler, aber es können dennoch die Zählungen um große Prozentzahlen falsch ausfallen. Wenn etwa die Quadratwurzel der in dem Fang enthaltenen Anzahl durchzählt worden ist, so werden die wahrscheinlichen Fehler bei Zählungen,

die über 100 Stücke hinausgehen, nur einige Prozente betragen. Für Genaueres darf auf die ausführliche Abhandlung *Abbes* verwiesen werden. Sind die Formen so klein, daß von ihnen ein Teil bei dem Fang oder doch bei der Hebung des Netzes über den Wasserspiegel verloren gehen muß, so werden die Resultate der Zählung sehr unsicher. Wenn die zu vergleichenden Fänge nahe das gleiche Volumen haben, kann der Fang der kleinen Planktonten vielleicht noch proportional, wenngleich immer unvollständig sein, sind aber die Volumina erheblich verschieden, so werden sich in dem größeren Volumen noch mehr der kleinen Planktonten gehalten haben als in dem kleinen Volumen. Die Zählungen werden nicht einmal über die relative Dichte dieser Formen ein richtiges Bild geben können. Unter allen Umständen wird es richtig sein, das Schlauchverfahren anzuwenden, wo es auf die Verfolgung dieser Nanoplanktonten ankommen sollte. Für flache Gewässer läßt sich auch immer ein Schlauch von größerem Lumen, als dem für die Befischung der Hochsee angegebenen, verwenden. Dadurch fallen dann die Stichproben entsprechend zuverlässiger aus.

Zum Schluß sei noch eine kleine Übersicht über die Zusammensetzung der Netzfänge in der Beltsee in verschiedenen Jahren und Jahreszeiten, wie sie von *K. Brandt* [1]) gefunden worden ist, hier mitgeteilt.

Prozentische Zusammensetzung der trocknen Fänge.

Datum	Eiweiß	Fett	Kohlehydrat	Organisch	Asche	SiO_2	Asche ohne SiO_2
3. Oktober 1892	21·84	2·12	66·10	90·06	9·14	4·95	4·99
13. Oktober 1892	20·24	2·26	68·95	91·45	8·55	4·59	3·96
15. November 1892	21·01	3·21	60·07	84·29	15·71	9·59	6·12
14. Februar 1893	20·41	4·35	45·50	71·17	29·68	16·33	13·35
15. März 1893	13·45	2·58	23·66	39·69	60·08	47·16	12·92
4. April 1893	15·56	4·24	18·79	38·59	61·41	51·26	10·15
5. Mai 1893	36·54	1·58	23·07	61·19	38·81	27·00	11·81
18. August 1893	33·56	8·72	38·31	80·59	19·41	10·95	8·46
18. September 1893	21·29	3·20	29·30	63·79	36·14	26·40	9·74
23. Februar 1894	58·80	7·40	22·88	89·08	10·92	2·31	8·61

Der Gehalt der Asche an Kieselsäure entfällt fast allein auf die Diatomeen, eine Bestimmung des Zellulosegehaltes würde sich auf die Hauptmasse der anderen Pflanzen beziehen, eine Bestimmung des Chitingehaltes würde hauptsächlich den Bestand an Krebsen treffen. Dabei wird es sich immer nur um eine annähernde Scheidung der Bestandteile eines Fanges und der Mischung der Meeresbewohner handeln können.

[1]) *K. Brandt*, Beiträge zur chemischen Zusammensetzung des Planktons. Wiss. Meeresuntersuchungen. N. F. Kiel. Bd. 3. 1898.

Das Arbeiten mit Organeiweiß.

Von **J. Pohl**, Prag.

Das Blut hat, mit Ausnahme der respiratorischen, osmotischen und Alkalifunktion, nur sehr wenige selbständige chemische Aufgaben: so könnten sich, da die als Vorstufe der Antitoxinbildung angenommene Abstoßung toxophorer Gruppen zu keiner bisher nachweisbaren Änderung in der analytischen Zusammensetzung der Organe geführt hat, auch die wesentlichsten Phasen der Antigenleistung in ihm abspielen, wofür die umfassende Änderung seiner Zusammensetzung während des Immunisierungsprozesses (Leukozytose, Globulinvermehrung, Fibrinvermehrung) spricht.

Die überwiegende Anzahl aller anderen Funktionen geht in den Organen vor sich. Während nun seit Bestand einer experimentellen Physiologie die Funktionen selbst tausendfältig studiert worden sind, ist dem Substrat derselben weit weniger Aufmerksamkeit geschenkt worden.

Zu den elementaren Bestandteilen jeder Zelle gehören ihre Eiweißkörper.

Ansatz und Abbau, also Wachstum und Mästung einerseits, Hunger und Krankheit andrerseits, kurz der Gesamtstoffwechsel, ob normal, ob abnormal, verlaufen unter ihrer Beteiligung und müssen sich zahlenmäßig an ihnen äußern.

Vergeblich sucht man für diese theoretisch konstruierten zellulären Vorgänge nach den entsprechenden analytischen Belegen.

Die Leichtigkeit, mit der die Eiweißkörper des Blutes, der Milch, der Sekrete zugänglich sind, ist der äußere Grund dafür gewesen, daß sich die Eiweißchemie und Eiweißbiologie vorwiegend mit ihnen als Ausgangsmaterial befaßt hat. So beschäftigt sich auch die moderne Immunochemie überwiegend mit dem Serum, während eventuelle Organveränderungen kaum in Betracht gezogen worden sind. Ursache hierfür ist das Unvertrautsein mit einer Methodik, die es gestattet, aus Organen dem Serum ähnliche, quantitative Bestimmungen zulassende Lösungen zu gewinnen. Nachdrücklichst auf eine solche hinzuweisen, das Verfahren zur Bestimmung qualitativer und quantitativer Änderungen des Eiweißbestandes sowie seine Anwendungsfähigkeit zu beschreiben, ist Aufgabe nachfolgender Zusammenstellung.

Der Ausdruck Organeiweiß bringt den literarischen Kampf zwischen *Voit* und *Pflüger* über dieses Thema in Erinnerung. *Voit* definierte jenes als das in den Organen befindliche, im Stoffwechsel nicht direkt angreifbare, fest gebundene Eiweiß im Gegensatz zu dem in den Säften gelösten, nicht organisierten Vorrats- oder zirkulierenden Eiweiß; ursprünglich meinte er auch, daß sich die Zersetzungen an letzterem abspielen. *Pflüger*[1]) stürzte diese Lehre; er wies nach, daß die Oxydation zellulär von statten geht. Daß das Nahrungseiweiß erst nach vorangegangener Organisation oxydabel sei, scheint ihm sicher. Wo aber und wie der zelluläre Aufbau erfolgt, wie der Weg vom Organischen zum Organisierten geht, das ist bis heute dunkel geblieben. *Pflüger* schließt seinen der Widerlegung *Voits* gewidmeten Aufsatz mit folgendem Passus: „Wenn die Wissenschaft einmal so weit fortgeschritten sein wird, zu entscheiden, ob alle Moleküle, die in der Zelle oxydiert werden, vorher Bestandteile der organisierten Materie gewesen sein müssen, wird es sich vielleicht herausstellen, daß wir einen Streit um des Kaisers Bart führten. Da die lebendige organisierte Materie die Nährstoffmoleküle chemisch verarbeiten soll, so muß sie dieselben doch packen, d. h. in ihren Bestand in bestimmter Weise einfügen. Nun wird es von der Begriffsbestimmung abhängen, ob ein solches zur Bearbeitung gepacktes Nährstoffmolekül, weil in die Organisation eingefügt, als Bestandteil der organisierten Materie anerkannt werden soll oder nicht. Es gibt ja gewiß in der organisierten Zellsubstanz sogar verschiedene Arten organisierter Eiweißmoleküle."

Die seitherige Erfahrung lehrt mich, daß in den ausgespülten Organen tatsächlich nur Eiweißkörper vorhanden sind, die gänzlich von denen des Blutserums verschieden sind. Es gibt somit ein Organeiweiß respektive Organeiweißkörper.

Gegenüber weit ausgreifenden allgemeinen Ausführungen aber ist es notwendiger, die stofflichen Änderungen der einzelnen Organe unter wechselnden Bedingungen zahlenmäßig kennen zu lernen. Voraussetzung hierzu ist die Kenntnis der Zelleiweißkörper. Im Vergleich zu der Fülle von Tatsachen, die in dem letzten Dezennium über die Abbau- und Spaltungsprodukte der direkt zugänglichen Eiweißkörper erforscht worden sind, stehen wir auf diesem Gebiete trotz seiner außerordentlichen Wichtigkeit in den Anfängen.

I.

Die parenchymatösen Organe enthalten nach den landläufigen Anschauungen Gewebsglobuline, Nukleoproteine, Stromine (Stützsubstanzen). Die wichtigsten Angaben bezüglich der wasserlösenden, salzlöslichen koagulablen Eiweißkörper sind folgende: *Ploß*[2]) fand in der Leber 1. einen

[1]) *Pflüger*, Über einige Gesetze des Eiweißstoffwechsels. Archiv f. Physiol. Bd. 54. S. 333. 1893.

[2]) *Ploß*, *Pflügers* Archiv. Bd. 7. 371. 1893.

bei 45° koagulablen, in Essig und Salzsäure löslichen, ganz verdaulichen Eiweißkörper; 2. ein bei 70° koagulables Nukleoalbumin (heute definiert man die Nukleoalbumine als inkoagulable Eiweißkörper); 3. einen bei 75° koagulablen Körper. *Halliburton*[1]) deutete zuerst die Organeiweißkörper für Nukleoalbumine identisch mit Gewebsfibrinogen. Später beschrieb er in der Leber ein im Überschuß von Essigsäure leicht lösliches Hepatoglobin, ein bei 68—70° ausfällbares Globulin, daneben ein Nukleoalbumin und etwas Albumin.

Bottazzi[2]) gewann 1895 aus der Milz ein Zytoglobulin α, koagulierbar bei 49°, ein Protein, koagulierbar bei 63—96°, ein Zytoglobulin β, bei 74—74° koagulierbar, und Zytoalbumine.

Die Muskeleiweißkörper, wie sie durch *v. Fürth*[3]) eine gründliche Revision erfahren haben, sowie die Schilddrüseneiweißkörper, die von *Oswald* genau beschrieben worden sind, mögen bei der nachfolgenden Zusammenstellung ausgeschlossen bleiben. Unsere Kenntnisse der eigentlichen Nukleoproteine basieren auf den Forschungen von *Kossel*, *Hammarsten*, *Halliburton*, *Gamgee*, *Wohlgemuth*, *Umber*, *Burian*, *Neumann*, *Mendel*, *Levene* u. a. m. und sind in anderen Teilen dieses Werkes beschrieben. Zur Darstellung derselben wurden meist die Filtrate koagulierter Organe benützt oder die gekochten Organfiltrate mit Pikrinsäure-Essigsäure und dann mit Alkohol gefällt. Daß hierdurch nur der kleinste Teil der tatsächlich vorhandenen Nukleoproteine in Untersuchung gezogen wurde, wird aus der folgenden Darstellung erhellen.

Die Gewinnung einer Organeiweißlösung, die ich wegen ihrer Beziehung zum Protoplasma und der Homologie zum Blutplasma als Organplasma bezeichne, hat ein vollständiges Freisein von Blutbestandteilen zur wesentlichen Voraussetzung. Am besten benützbar ist die Leber, Niere, Milz, Plazenta, Herz, kurz Organe mit leicht präparierbaren zuführenden Gefäßen; doch auch aus dem Gehirn, peripheren Nerven, nicht minder aus embryonalen Organen, ja selbst aus dem Kaltblüterorganismus lassen sich derartige Eiweißauszüge gewinnen. Die Ausspülung, die bei der Leber von der Vena cava rückläufig erfolgt, wird mit einer kalziumfreien, aus reinstem Kochsalz dargestellten 0·8%igen Kochsalzlösung so lange durchgeführt, bis das Spülwasser aus den abführenden Gefäßen farblos abläuft.

Für qualitative Arbeiten genügt es, das völlig entblutete Organ sodann zu einem Brei zu zerkleinern, eventuell durch Siebe durchzupressen und den mit entsprechenden Mengen physiologischer Kochsalzlösung nach Toluol- oder Benzolzusatz tüchtig durchgeschüttelten Organbrei 24 Stunden in der Kälte stehen zu lassen. Dann wird filtriert, die ersten Anteile sind

[1]) *W. D. Halliburton*, The proteids of kidney and liver cells. Journal of physiology. Vol. 13. 808. 1880.

[2]) *Bottazzi*, Les substances albuminoides de la rate. Arch. ital. Biolog. 1895. S. 453.

[3]) *v. Fürth*, Über die Eiweißkörper des Muskelplasmas. Arch. f. exper. Path. Bd. 36. S. 231. 1895.

gewöhnlich trüb, nach wiederholtem Zurückgießen des Filtrates erhält man aber schließlich völlig klare, in ihrem Aussehen an ein Blutserum erinnernde Lösungen. Selbst aus glykogenhaltigen Lebern wird schließlich ein hellgelbes Plasma gewonnen.

Für quantitative Arbeiten ist es besser, den Organbrei nach Durchpressen durch Siebe auf Glasplatten im Ventilator bei Zimmertemperatur rasch zu trocknen. Die getrockneten Pulver[1]) verwahrt man über konzentrierter Schwefelsäure, wodurch sie wochen- und monatelang unverändert bleiben. Die weitere Verarbeitung siehe im Folgenden S. 667. Doch sei hervorgehoben, daß in wechselnden Verhältnissen schließlich ein Teil der Gewebseiweißkörper wasserunlöslich wird, somit rasches Verarbeiten wohl immer zu empfehlen ist.

II. Eigenschaften der Organplasmen.

Das Organplasma gibt alle Farben- und Fällungsreaktionen der Eiweißkörper, so z. B. eine positive Glyoxylsäure, positive Xanthoprotein- und *Millon*sche Reaktion.

Mit Neutralsalzen kann man Fällungen erzwingen.

So gibt konzentrierte Kochsalzlösung innerhalb 24 Stunden flockige Fällung; das Filtrat gibt auf Eintragen von Kochsalz in Substanz neuerlich einen Niederschlag; das Filtrat hiervon, verdünnt, gibt wieder mit Ammonsulfatfällung und selbst das weitere Filtrat läßt auf Säurezusatz noch spärliche Flocken ausfallen. Bei Verwendung konzentrierter Ammonsulfatlösung ist eine deutliche, spatiengesonderte, fraktionierte Scheidung in verschiedene Eiweißindividuen nicht möglich.

Die Eigenschaften solcher Organplasmen ähneln in vielem den durch ein homologes Verfahren gewonnenen Muskelplasmen. Schon durch die bekannte *Miescher*sche Beobachtung vom Schwund der Muskelsubstanz beim Aufbau der Genitaldrüsen des Lachses ist eine gegenseitige Beziehung zwischen Muskel und parenchymatösen Organen zu vermuten. Immerhin bestehen zwischen Muskel- und Organplasma deutliche Unterschiede.[2])

Aus den Organplasmen läßt sich durch verdünnte Essigsäure (0·1 bis 0·2%), besonders sicher nach Zusatz kleiner Mengen gesättigter Kochsalzlösung (z. B. auf 100 cm^3 Plasma 5—6 cm^3 konzentrierter Kochsalzlösung) ein flockig ausfallender Körper gewinnen, der im Gegensatz zur Säurefällung aus verdünntem Serum(Para-)globulin in Neutralsalzen unlöslich ist, er sei in Folgendem als Essigsäurekörper bezeichnet.

Dieser Eiweißkörper ist optisch inaktiv, durch Diffusion nicht fällbar, sondern nur in Form einer opaleszenten visziden Kolloidlösung zu erhalten. Die Kolloidlösung koaguliert nicht, gewinnt aber dieses Vermögen sofort

[1]) *W. Wiechowski*, Eine Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe. *Hofmeisters* Beiträge. 9. 240. 1907.

[2]) Näheres über dieses Verhalten siehe in meiner Arbeit „Über Organeiweiß". *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 7. S. 390. 1905.

auf Salzzusatz und ebenso wird die Essigsäurefällung bei einer solchen diffundierten Lösung erst nach Salzzusatz möglich. Durch Pepsineinwirkung ist der Organeiweißkörper bis auf kleine Reste vollkommen verdaulich. Höchst eigenartig und sicher von biologischer Bedeutung ist seine Koagulationstemperatur. Er koaguliert (sowohl im nativen Plasma, als auch aus der Säurefällung in Alkali gelöst) bei auffallend niedriger Temperatur, bei 38—39° vollständig, ja selbst bei 35 und partiell noch bei tieferer Temperatur. Die Plasmalösungen haben überhaupt, ähnlich wie sonst Globuline, die Tendenz, allmählich schon bei Zimmertemperatur auszufallen. Diese Koagulationsfähigkeit wird aufgehoben oder gehemmt durch Blutserum respektive die Bluteiweißkörper. Kalziumzusatz zum Blutserum hebt dessen hemmende Wirkung auf.

Die analytische Zusammensetzung des Essigsäurekörpers erhellt aus folgenden Werten zweier Bestimmungen:

	I	II
C	47·21%	48·43%
N	16·35%	16·71%
H	6·79%	6·98%
S	0·97%	0·99%
P	—	1·3%

Mit Rücksicht auf die Koagulationsfähigkeit, die fast restlose Verdaulichkeit der Ausfällbarkeit durch schwache Säuren, wie Kohlensäure, die Salzfällungsgrenzen, die Ungiftigkeit bei intravenöser Injektion war ich anfangs geneigt, diesem Körper Globulinnatur zuzuschreiben. Schon in meiner ersten Mitteilung schrieb ich, daß aber doch auf eine Beziehung zwischen dem Plasmaglobulin und den Nukleoproteiden einzugehen sein wird. „Speziell wird das *Hammarsten*sche a-Nukleoproteid des Pankreas, das dem Gewebsfibrinogen (*Wooldridge*), dem Zellglobulin (*Halliburton*), dem Muskelalbumin nahestehen soll, sowie auch das *Wohlgemuth*sche Leberprotein zu besprechen sein.“ Vor allem aber ist das mir damals entgangene *Umber*sche Pankreasproteid hier einzubeziehen. Nun konnte ich seitdem feststellen, daß der Essigsäurekörper typische Orzinreaktion gibt.

Das Absorptionsband des Orzinfarbstoffes in Amylalkohol war z. B. bei Arabinose zwischen C und D, respektive zwischen 88·5 und 102, bei einem Schweinsleberessigsäurekörper zwischen 89·5 und 99 der Skala meines Spektralapparates.

Der Komplex enthält somit sicher eine Pentose. Der Reichtum der Organe an Pentosen erhellt bereits aus früheren Befunden: ich erinnere nur an die quantitative Studie von *Grund*[1]), der unter Benützung des Furfurolverfahrens für eine Leber allein einen Gehalt von 1·85, für den Muskel einen solchen von 7·38 annimmt und bereits auf die große prin-

[1]) *Grund*, Über den Gehalt des Organismus an gebundenen Pentosen. Zeitschr. f. phys. Chem. Bd. 35. S. 131. 1902.

zipielle Bedeutung seines Befundes hinweist. Es scheint mir wichtig, zu betonen, daß auch in den Organplasmen pentosehaltige Eiweißkörper von geradezu universeller Verbreitung vorliegen.

Ferner ließ sich im Essigsäurekörper nach Salzsäurehydrolyse ein Purinkörper nachweisen. Verfuhr ich nach dem *Umber*schen Verfahren, so erhielt ich kein Guanin, wenn ich aber die eingeengte Schlußlösung mit ammoniakalischem Silber fällte, den mit Schwefelwasserstoff zersetzten Niederschlag filtrierte und einengte, so gab die Lösung die charakteristische Salpetersäurereaktion, die Sublimatreaktion positiv, die *Weidel*sche Chlorreaktion blieb negativ. Trotz der kleinen Mengen des Ausgangsmaterials, wodurch naturgemäß nur qualitative Reaktionen vorgenommen werden konnten, entscheiden diese Erfahrungen, daß der Essigsäurekörper ein Nukleoproteid ist, wofür sich seither auch *Hammarsten*[1]) ausgesprochen hat.

Die Bezeichnung Nukleoproteid ist in chemischem Sinne zu nehmen, dem Kern allein gehören die löslichen Organeiweißkörper nicht an.

Am nächsten steht der Körper dem *Umber*schen Pankreasproteid und ist vielleicht mit ihm identisch. Den Umfang der Verdaulichkeit desselben lehren folgende Zahlen: 1·06 chlorfrei gewaschener und getrockneter Hundeleberessigsäurekörper hinterläßt nach mehrtägiger Pepsinsalzsäureverdauung einen unansehnlichen, braun pigmentierten Rückstand von 0·011 *g*.

Zur erschöpfenden Charakteristik eines Eiweißkörpers gehört neben der Feststellung der Eigenschaften des unveränderten genuinen Stoffes die Beschreibung seiner Spaltungsprodukte. Da aber die *Emil Fischer*sche Methode der Aminosäurebestimmung und noch weniger das *Kossel-Kutscher*sche Verfahren der Basenbestimmung quantitativ sind, es außerdem mir nicht möglich war, jene großen Mengen an Material darzustellen, wie sie zur Anwendung dieser Methoden Voraussetzung sind (eine ganze Schweinsleber liefert nur 325 *g* lufttrockenes Pulver, aus dem nach Behandlung mit Toluolazeton nur 8·2 *g* unseres Körpers gewonnen werden, ebenso aus 10 *kg* frischer Rindsleber nur 23 *g*), so bediente ich mich des *Pfaundler-Gümbel*schen Verfahrens zur Bestimmung der N-Verteilung.

Zur Beurteilung der gewonnenen Zahlen sei hervorgehoben, daß im Gegensatz zu den Bluteiweißkörpern eine Reinigung des Essigsäurekörpers in strengem Sinne nicht möglich ist: während man Globulin, Albumin mit den fällenden Salzlösungen auswaschen, wiederholt lösen und fällen kann, ist dies hier nicht zulässig. Beim Auflösen des sauren Niederschlages in Alkali bildet sich äußerst leicht Alkalialbuminat. Beim Neutralisieren entweicht Schwefelwasserstoff, ein Beweis für eine stattgehabte Zystinzersetzung. Die Proben sind dann niemals klar und geben, im Gegensatz zum ursprünglichen Plasma, bereits mit $^1/_6$ Ammonsulfat reichliche Niederschläge.

[1]) *Hammarsten*, Lehrb. d. physiol. Chem. 9. Aufl. 1910.

Tabelle I.

	I	II	III	IV	V	VI			
	Menschenleber	Menschen-Amyloïd-leber	Schweinsleber	Dieselbe Schweinsleber	Rindsleber	Dieselbe Rindsleber	Globulin nach *Hausmann*[1])	Albumin nach *Rothera*[2])	
Gesamt-N in %	16·00	15·9	15·98	15·98	15·24	15·24	15·83	15·93	
NH_3-N	7·06	8·1	7·77	7·0	7·79	7·2	8·9	6·47	Die Zahlen = Prozent des Gesamt-N
Monoaminosäure-N . . .	61·5	61·4	63·64	59·4	66·05	66·5	68·3	62·6	Die Zahlen = Prozent des Gesamt-N
Melanin- und Diaminosäure-N . . .	31·43 ber.	3·8 26·7 30·5	0·53 28·06 28·59	1·37 32·23 33·60	1·47 24·49 25·96	1·74 25·0 26·74	24·9 best.	32·0	Die Zahlen = Prozent des Gesamt-N

Die Tabelle zeigt, daß der Essigsäurekörper sich im wesentlichen den Serumeiweißkörpern nähert, es fällt z. B. das Mittel der Monoaminosäuren mit 63% zwischen die entsprechenden Globulin- und Albuminwerte.

Neben dem durch 0·2% Essigsäure fällbaren Körper enthalten die Plasmen noch einen zweiten Eiweißkörper. Derselbe ist durch gleich niedrige Temperatur, wie der erste, nicht ausfällbar, ist ebenfalls inaktiv und nach dem positiven Ausfall der Orzinreaktion pentosenhaltig, somit wohl ebenfalls ein Nukleoproteid. Doch sei hervorgehoben, daß sich das Spektralband der amylalkoholischen Lösung in Einzelheiten etwas anders verhält als das des ersteren. Hat man ein Plasma mit 0·2%iger Essigsäure ausgefällt, sättigt das Filtrat mit Ammonsulfat in Substanz, so erhält man das zweite Proteid mit den eben beschriebenen Eigenschaften.

Fasse ich zusammen, so ergibt sich, daß die löslichen Organeiweißkörper trotz der Ähnlichkeit der Gesamtanalyse und Gesamthydrolyse toto coelo vom Blutserum verschieden sind.

Nach Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung kann man die Organpulver noch mit 0·05% Soda extrahieren, die Rückstände durch Diffusion aufschließen. Die möglichen Verfahren zur Aufstellung einer Gesamtbilanz der Eiweißkörper eines Organs, wie sie sich auf Grund vorstehender Erfahrungen entwickelt haben, sind von *Wiechowski*[3]) zusammengefaßt worden und mögen hier wegen ihrer allgemeinen Anwendbarkeit noch einmal Platz finden.

[1]) *Hausmann*, Über die Verteilung des Stickstoffs im Eiweißmolekül. Zeitschr. f. physiol. Chem. 27. S. 104. Tabelle IV. 1899.

[2]) *Rothera*, Zur Kenntnis der Stickstoffbindung im Eiweiß. *Hofmeisters* Beiträge. V. 447. 1904.

[3]) *Wiechowski*, l. c. *Hofmeisters* Beiträge. Bd. 9. S. 232. 1907.

Tabelle 2. Schema I.

Organ, ausgespült bei 30°
getrocknet, mit Toluol vermahlen und erschöpft

I. Toluolextrakt — Rückstand mit Alkohol erschöpft

II. Alkoholextrakt — Rückstand mit 0·8%iger Kochsalzlösung erschöpft (Filtration)

III. Filtrat „Plasma“ — Rückstand mit 0·05%iger Sodalösung erschöpft (Filtration)

IV. Filtrat — Rückstand (in Säuren und Laugen lösl. Eiweißkörper

Schema II.

Mit Toluol und Alkohol extrahiertes Organpulver mit 0·8%iger NaC-Lösung vermahlen und auf dem Filter eiweißfrei gewaschen

„Plasma“ — Rückstand mit 0·05%iger Soda vermahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert, dann zentrifugiert

Opaleszentlösliche Organfraktion zusammen mit Fraktion IV des vorhergehenden Schemas — Rückstand

Schema III.

Mit Toluol und Alkohol extrahiertes Organpulver mit 0·05%iger Sodalösung vermahlen und gegen dieselbe Flüssigkeit dialysiert. Suspension gegen 0·05% Sodalösung dialysiert, hierauf mit der gerade ausreichenden Menge Kaliumazetat gefällt und filtriert, Umfällen, bis das Filtrat eiweißfrei ist

Filtrat-Plasma + Fraktion IV des Schema I — Rückstand nach Dialyse zentrifugiert und durch Zentrifugieren völlig ausgewaschen

V. Zentrifugat opaleszent — VI. Rückstand

III.

Das Arbeiten mit Organen erstrebt verschiedene Ziele, von denen die wesentlichsten hier angeführt werden mögen:

a) Die Feststellung spezifischer Giftwirkungen derselben (Nebenniere, Hypophyse, Schilddrüse).

b) Darstellung von Zytotoxinen, Antikörpern,

c) Fermentisolierung und Fermentbestimmung,

d) Änderung ihrer quantitativen Zusammensetzung unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen.

Die folgenden Ausführungen können sich nur mit dem letztgenannten Problem befassen, da die ersteren bereits an anderen Stellen dieses Werkes eine zusammenfassende Darstellung gefunden haben.

Die nachgewiesene Möglichkeit der Isolierung einzelner Organeiweißkörper gestattet nunmehr, an bestimmte biologische Fragen heranzutreten. Vor allem erhebt sich die Frage: Ändert sich die Zusammensetzung eines Organes in bezug auf seine Eiweißkörper bei bestimmten Erkrankungen?

Als Beispiel einer Methodik in dieser Richtung sei auf die Studie *Orgelmeisters*[1]) über die Änderung des Eiweißbestandes der Niere durch Entzündung hingewiesen.

Zur Feststellung von Veränderungen dieses Organplasmas wurde in diesen Versuchen, die nunmehr schon einige Jahre zurückdatieren, ähnlich wie es sonst beim Blutserum üblich ist, durch Bringen des Nierenplasmas auf eine Konzentration von 25, 33 und 50% Ammonsulfat eine quantitative Vorstellung über die Zusammensetzung des Organs gewonnen. Die Nieren werden, womöglich unmittelbar nach dem Tode des Tieres, direkt von der Arteria renalis aus mit physiologischer Kochsalzlösung durchspült und möglichst vollkommen vom Blute befreit.

Wegen des ziemlich großen Widerstandes, den die Flüssigkeit in den Nierengefäßen findet, eignet sich hierzu am besten eine 50—100 cm^3 fassende Spritze. Zur Ausspülung benötigt man nur einige Minuten. Hierauf werden die Nieren von der Kapsel und den Hilusgefäßen befreit, zerkleinert, der Brei gewogen, mit der doppelten Gewichtsmenge physiologischer Kochsalzlösung und einigen Tropfen Toluol versetzt und in einen verschlossenen Glaszylinder aufbewahrt; das Filtrat wird nun, wie oben ausgeführt, fraktioniert. In der Norm ergab sich das Verhältnis von

33% Sättig. (homolog mit Euglobulin) : 50% Ges.-Globulin (Eu- u. Pseudglob.) :
6 : 55·5 :

100% Sättig.
100

Bei allen Formen akuter Nephritis trat nun eine derartige Veränderung ein, daß es auf Kosten der dritten Fraktion zur Vermehrung der ersten und zweiten kam. Z. B. war das Verhältnis nach Sublimatnephritis 37 : 77 : 100. Nach Kaliumbichromat 30 : 64 : 100, Jodoform 15·9 : 65 : 100, Diphtherietoxin 24 : 92 : 100. Weitere Details mögen in der Originalarbeit nachgesehen werden.

Zur Feststellung quantitativer Organveränderungen bediene ich mich seither eines empfehlenswerteren Verfahrens: Das, wie oben beschrieben, erhaltene Organpulver wird in bestimmten Mengen bald mit, bald ohne vorhergehende Toluolextraktion in der Pulvermühle[2]) mit physiologischer Kochsalzlösung zerrieben und gewöhnlich in 1%iger Lösung nach Toluolzusatz 24 Stunden stehen, respektive um eine völlige und gleichmäßige Extraktion zu ermöglichen, verschlossen liegen gelassen. Vom Filtrat wird ein

[1]) *Orgelmeister*, Änderung des Eiweißbestandes der Niere durch Entzündung. Zeitschr. f. exper. Path. u. Therap. Bd. 3. S. 221. 1906.

[2]) *Wiechowski*, Dieses Handbuch. Bd. 3. S. 297. 1910.

möglichst großer Teil (z. B. 50 cm^3) nach Zusatz von etwas gesättigter Kochsalzlösung mit 0·2%iger Essigsäure ausgefällt. Die Fällung wird nach mehrstündigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 0·8%iger Kochsalzlösung eiweißfrei, dann mit heißem Wasser chlorfrei gewaschen, schließlich nach Behandlung mit Alkohol und Äther getrocknet und gewogen und auf das Gesamtvolumen, respektive immer auf 1 *g* Organpulver berechnet. In einer weiteren Probe, z. B. 25 cm^3, bestimmt man Gesamteiweißgehalt des Plasmas und eigens den Gesamteiweißgehalt des Organpulvers. Man vergleicht somit pro Gramm Organpulver Gesamteiweißgehalt mit dem Gehalt der in physiologischer Kochsalzlösung löslichen Eiweißkörper und der Menge des Essigsäureproteids unter den verschiedenen biologischen Verhältnissen.

Es folgen zunächst Beispiele über den Einfluß des Hungers auf den Eiweißquotienten, auf die Eiweißbilanz. Es ist längst bekannt, daß im Hunger die einzelnen Organe an Gewicht abnehmen, und zwar in verschiedenem Ausmaße. Die Verteilung dieser Abnahme auf die einzelnen Eiweißkörper war erst festzustellen. Zum Vergleich müssen zunächst Normalwerte angeführt werden.

Tabelle 3.

Normalkaninchen, 2 *kg* Gewicht, Leber mit Toluol extrahiert.

Versuchs-Nr.	1		2	
Gesamteiweiß pro 1 *g* trockenes Pulver	0·66	100%	0·6239	100%
Gesamteiweiß pro 100 cm^3 Plasma 1 : 100	0·17	25·7%	0·175	28%
0·2%ige Essigsäurefällung in 100 cm^3 Plasma	0·12	18·2%	0·112	17·9%

Tabelle 4.

Hungerversuche, Kaninchen, Leber mit Toluol extrahiert.

Versuchs-Nr.	3		4		5	
Gewicht zu Beginn den Versuches	14./II. 1550		14./II. 1450		7./XII. 2700	
Gewicht zu Ende den Versuches	21./II. 860		23./II. 1030		19./XII. 1980	
Gesamteiweiß pro 1 *g* trockenes Pulver	0·83	100	0·735	100	0·559	100
Gesamteiweiß des Plasma aus 1 : 100	0·038	4·7	0·0125	1·6	0·115	20
0·2%ige Essigsäurefällung in 100 cm^3 Plasma	0·022	2·6	0·012	1·6	0·088	15

Die Zahlen zeigen, daß beim Kaninchen durch Hunger eine Verschiebung der Organeiweißquotienten stattfindet. Das Schwinden der Fette und Kohlehydrate erklärt die absolute Zunahme der Gesamteiweißwerte: die wasserlöslichen Eiweißkörper sind stark vermindert. Sie wurden somit sicher zur Zersetzung, zur Befriedigung des Eiweißbedürfnisses herangezogen, ein Moment, das auf ihre physiologische Dignität hinweist. Dieser Versuchstypus ist wohl als Grundlage für fernere Versuche über die Assimilation zu verwerten. Welcher Art müssen die Eiweißkörper sein, die am schnellsten zur Wiederherstellung des normalen Eiweißgleichgewichts führen? Sind die abiureten Spaltungsprodukte — im ganzen oder fraktioniert — auch in dieser Richtung imstande, die nativen Nährstoffe zu ersetzen? Als Grundlage für diese und ähnliche Versuche ist es wünschenswert, die Karnivoren heranzuziehen: diesem Zwecke dienen folgende Tabellen.

Tabelle 5.

Normal-Hundeleber, Toluol extrahiert.

Versuchs-Nr.	6		7		8		9	
Gesamteiweiß pro 1 *g* .	0·67	100%	0·69	100%	0·747	100%	0·75	100%
Gesamteiweiß pro 100 cm^3 Plasma 1 : 100 . . .	0·209	31%	0·217	32%	0·25	33·4%	0·24	33·4%
0·2%ige Essigsäurefällung auf 1 *g*	0·127	18%	0·123	18·3%	0·18	24%	0·16	21%

Tabelle 6.

Hundeleber, Hungerversuche.

Versuchs-Nr.	10		11		12 a Leber		12 b Niere	
Gewicht zu Beginn	4./XII. 6200		2./I. 8600		6./II. 8600		8600	
Zu Ende des Versuches	12./XII. 5000		10./I. 7200		24./II. 6450		6450	
Gesamteiweiß pro 1 *g*	0·746	100%	0·794	100%	0·758	100%	0·625	100%
Gesamteiweiß des Plasmas von 1 *g* (auf 100) . . .	0·164	21·9%	0·263	15%	0·287	37%	0·166	26·4%
0·2% Essigsäure auf 1 *g*	0·109	14·5%	0·119	33%	0·208	26%	0·132	20·8%

Trotz andauernden Hungers ist also beim Hunde zwar ein Zurückgehen, aber kein dem Kaninchen homologes mächtiges Absinken des Essig-

säurekörpers der Leber zu verzeichnen (siehe die Prozentzahlen). Hier spielen gewiß Rasse und Fütterungsart vor dem Hungerversuch sehr bedeutsam mit. So war es merkwürdig, wie munter der letzte Hund trotz 18tägigem Hungern war: voll Temperament und Beweglichkeit konnte er nach dieser Zeit kaum zum Stillstehen auf der Wage gebracht werden. Gerade für Giftwirkungen, die am Hunde quoad Einflußnahme auf das Organeiweiß durchzuführen sein werden, ist es von Wichtigkeit zu wissen, daß der verringerten Nahrungsaufnahme für die Leberzahlen keine rasch eintretende Bedeutung zukommt.

Von der Vorstellung ausgehend, daß in der Darmwand als der Stelle der Eiweißsynthese oder der Eiweißanhydrierung sich Ansatz oder Verbrauch äußern könnte, wurde in folgenden Versuchen der Gehalt der Darmschleimhaut an unseren Eiweißkörpern unter wechselnden Verhältnissen bestimmt (Tabelle 6).

Tabelle 7.

Darmschleimhautversuche.

Gefütterte Hunde.

Versuchs-Nr.	13		14	
Gesamteiweiß pro 1 *g* . .	0·738	100%	0·75	100%
Plasmaeiweiß pro 1 *g* . .	0·3004	40·6%	0·254	33·88%
Essigsäurekörper pro 1 *g* .	0·15	20·2%	0·18	24%

Hungerhunde.

Versuchs-Nr.	15		16		
Bemerkung . . .	2 Hungertage		15 Hungertage		Tier des Versuchs 16 von 26·15 auf 20·35 *kg* abgenommen, wird verblutet
Gesamteiweiß pro 1 *g*	0·767	100%	0·804	100%	
Plasmaeiweiß pro 1 *g*	0·192	25%	0·180	22·4%	
Essigsäurekörper pro 1 *g*	0·11	14·9%	0·087	10·8%	

Die Hungerdarmschleimhautversuche des Hundes stimmen prinzipiell mit den Leberhungerversuchen am Kaninchen: die absoluten Eiweißmengen pro Gramm Organpulver gehen in die Höhe, die löslichen Eiweißkörper, insbesondere die Essigsäurekörper, schwinden beträchtlich.

Von Giften, die den Eiweißbestand angreifen und von denen ein Einfluß auf die Leber zu erwarten war, wählte ich Phosphor und Arsenik.[1])

Versuch 17. Ein 1750 *g* Kaninchen erhält 0·01 P in 0·2%iger Öllösung per os am 12./I. Am 15./I. tot. Die Sektion ergibt maximale Leberverfettung.

Die pro 1 *g* mit Toluol behandelten Pulvers erhobenen Werte der Leber waren: Gesamteiweiß = 0·782, lösliche Eiweißkörper = 0·0984, mit Essigsäure fällbar = 0·065.

Der Vergleich mit den Normalzahlen S. 668 ergibt somit eine außerordentliche Verarmung an löslichen Eiweißkörpern!

Wesentlich übereinstimmend verläuft die orale Phosphorintoxikation am Hunde:

Versuch 18. Hund 6400 erhält 5 *cm*³ Phosphoröl (0·2 auf 100) per os. Am 3. Tag 4400, tot vorgefunden. Typische Fettleber.

Die Eiweißwerte: Gesamteiweiß = 0·790, lösliche Eiweißkörper = 0·118, Essigsäurekörper = 0·055.

Die schwere Schädigung der Leber beziehe ich auf den direkten Insult durch das mit Phosphor überladene Blut, eine Intoxikationsform, wie sie ausschließlich beim Menschen vorkommt.

Führt man den Phosphor subkutan zu, dann ist die Lebereiweißschädigung trotz hochgradiger Verfettung nicht nachweisbar gewesen.

Versuch 19. Hund 7820, erhält an 5 Tagen je 1 *cm*³ 0·2%iges Phosphoröl subkutan. Am 6. Tage 6950, wird verblutet. Leber: mikroskopische Fettinfiltration.

Eiweißverteilung: Gesamteiweiß pro 1 *g* = 0·724, lösliches Eiweiß = 0·257, Essigsäure fällbar = 0·1548.

Hier ist als Maß der Intoxikation die Fettbestimmung entscheidend. Jedenfalls zeigt der Versuch, was bei der Proteusnatur der Vergiftungsbilder mit P ohnehin zu erwarten, daß sich eine hochgradige Störung des Fettgehalts völlig unabhängig vom Eiweißbestande vollziehen kann.

Über den Verlauf der Arsenikversuche nur kurz folgendes:

Versuch 20. Kaninchen von 1030 *g* fällt nach zweimal 0·02 *g* As_2O_3 p. K. in 4 Tagen auf 900 *g* Gewicht.

1 *g* Leberpulv. gibt 0·7 Gesamteiweiß mit 0·11 Plasmaeiweiß u. 0·07 Essigs.-Körp.
in Prozenten: 100 : 15 : 10

Versuch 21. Kaninchen von 1620 *g* fällt nach zweimal 0·02 *g* As_2O_3 p. K. in 3 Tagen auf 1470 *g* Gewicht.

1 *g* Leberpulv. gibt 0·73 Gesamteiw. mit 0·137 Plasmaeiw. u. 0·098 Essigs.-Körp.
in Prozenten: 100 : 18 : 13·4

In ähnlicher Weise geht nach wiederholten Aderlässen, die unter starker Gewichtsabnahme bis zum Tode der Tiere durchgeführt werden, die Menge des Essigsäureproteïds beträchtlich herunter. Und so läßt sich, die

[1]) Siehe die zu ähnlichen Resultaten gelangende Arbeit von *B. Slowtzoff*, Die chemischen Veränderungen in Phosphorlebern. Biochem. Zeitschrift. Bd. 31. S. 227. 1911.

vorstehenden Erfahrungen zusammenfassend, der Satz aufstellen, daß jeder zu deutlichem Gewichtsverlust führende Prozeß, möge er auf welche Art auch immer ausgeführt worden sein, sich in einer mehr minder deutlichen Abnahme unserer Leberproteïde spiegelt: eine Spezifität kommt diesem Befund nicht zu. So möchte ich noch erwähnen, daß Immunisierung von Tieren mit heterologem Serum bis zum Auftreten kräftigster, schon bei Zimmertemperatur erfolgender Präzipitation durchaus zu keiner Änderung der Eiweißquotienten zu führen braucht, falls die Tiere keine Gewichtsabnahme zeigen. Tritt aber der letztere Fall ein, so kommt es auch hier zur beschriebenen Änderung im Organeiweißbestand.

Vorstehende Ausführungen mögen die Anregung zu weiteren Versuchen mit Bestimmung der Eiweißkörper der Organe unter wechselnden Bedingungen geben. Ich schließe mit folgendem Ausspruch *E. Abderhaldens*[1]: „Organeiweiß“ unter normalen und pathologischen Verhältnissen zu untersuchen, hat viel Verlockendes für sich. Es ist ein reizvoller Gedanke, dem rein morphologischen Studium pathologischer Zellabartungen eine genauere Kenntnis der Lebensprozesse der veränderten Zelle an die Seite zu setzen, denn, daß nicht äußere Strukturverschiebungen das Wesen krankhafter Prozesse ausmachen, sondern ganz offenbar in erster Linie Veränderungen im gesamten Stoffwechsel der Zelle, ist ganz klar.“

[1]) *E. Abderhalden*, Klinische Eiweißuntersuchungen. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Ther. Bd. 2. S. 648. 1906.

Druck von Gottlieb Gistel & Cie. in Wien.









